

10/548748

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

Rec'd PCT/PTO 8 - JAN 2006

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
23. September 2004 (23.09.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/081217 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/82, C07K 14/415, C12N 15/29, A01H 5/00
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/002436
- (22) Internationales Anmeldedatum:
10. März 2004 (10.03.2004)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
103 11 118.2 12. März 2003 (12.03.2003) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): BASF PLANT SCIENCE GMBH [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): FRANK, Markus [DE/DE]; Rheindammstrasse 30, 68163 Mannheim (DE). KOGEL, Karl-Heinz [DE/DE]; Berggartenstrasse 7, 35457 Lollar (DE). HÜCKELHOVEN, Ralph [DE/DE]; Glaubrechtstr. 12, 35392 Giessen (DE).
- (74) Anwalt: BIEBERBACH, Andreas; BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (*soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (*soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zwei-Buchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR INCREASING RESISTANCE AGAINST STRESS FACTORS IN PLANTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ERHÖHUNG DER RESISTENZ GEGEN STRESSFAKTOREN IN PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing or increasing resistance against at least one biotic or abiotic stress factor in plants, preferably against plant pathogens, by increasing expression of at least one Bax inhibitor 1 (BI1) protein in at least one plant tissue, under the proviso that expression in leaf epidermis remains substantially unmodified. The invention relates further to recombinant expression cassettes and vectors that comprise a nucleic acid sequence coding for the BI protein under the control of a tissue-specific promoter, said promoter having substantially no activity in leaf epidermis. The invention further relates to recombinant plants that are transformed with said expression cassettes or vectors, to cultures, parts or recombinant propagation material derived thereof, and to the use of the same for producing food, feeding stuff, seeds, pharmaceuticals or fine chemicals.

WO 2004/081217 A2

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen mindestens einen biotischen oder abiotischen Stressfaktor in Pflanzen, bevorzugt gegen pflanzliche Pathogene, durch Erhöhung der Expression mindestens eines Bax-Inhibitor 1 (BI1) Proteins in mindestens einem pflanzlichen Gewebe mit der Massgabe, dass die Expression in der Blattempidermis im wesentlichen unverändert bleibt. Die Erfindung betrifft ferner rekombinante Expressionskassetten und Vektoren, die eine für ein BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors umfassen, wobei der Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattempidermis aufweist. Die Erfindung betrifft ferner mit besagten Expressionskassetten oder Vektoren transformierte rekombinante Pflanzen, davon abgeleitete Kulturen, Teile oder rekombinantes Vermehrungsgut, sowie die Verwendung derselben zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

Verfahren zur Erhöhung der Resistenz gegen Stressfaktoren in Pflanzen

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen mindestens einen biotischen oder abiotischen Stressfaktor in Pflanzen, bevorzugt gegen pflanzliche Pathogene, durch Erhöhung der Expression mindestens eines Bax-Inhibitor 1 (BI1) Proteins in mindestens einem pflanzlichen Gewebe mit der Maßgabe, dass die Expression in der Blattepidermis im wesentlichen unverändert bleibt. Die Erfindung betrifft ferner rekombinante Expressionskassetten und Vektoren, die eine für ein BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors umfassen, wobei der Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist. Die Erfindung betrifft ferner mit besagten Expressionskassetten oder Vektoren transformierte rekombinante Pflanzen, davon abgeleitete Kulturen, Teile oder rekombinantes Vermehrungsgut, sowie die Verwendung derselben zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

Ziel biotechnologischer Arbeiten an Pflanzen ist die Herstellung von Pflanzen mit vorteilhaften, neuen Eigenschaften zum Beispiel zur Steigerung der landwirtschaftlichen Produktivität, zur Qualitätssteigerung bei Nahrungsmitteln oder zur Produktion bestimmter Chemikalien oder Pharmazeutika. Oft sind die natürlichen Abwehrmechanismen der Pflanze gegen Pathogene unzureichend. Allein Pilzerkrankungen führen zu Ernteverlusten in der Höhe von vielen Milliarden US-\$ jährlich. Die Einführung fremder Gene aus Pflanzen, Tieren oder mikrobiellen Quellen kann die Abwehr verstärken. Beispiele sind der Schutz gegen Insektenfraß in Tabak durch Expression von *Bacillus thuringiensis* Endotoxinen (Vaeck et al. (1987) Nature 328:33-37) oder der Schutz des Tabaks gegen Pilzbefall durch Expression einer Chitinase aus der Bohne (Broglie et al. (1991) Science 254:1194-1197). Die meisten der beschriebenen Ansätze gewähren jedoch nur eine Resistenz gegen ein einzelnes Pathogen oder gegen ein schmales Spektrum von Pathogenen.

40

Es gibt nur wenige Ansätze, die Pflanzen eine Resistenz gegen ein breiteres Spektrum von Pathogenen, vor allem Pilzpathogene, verleihen. Die systemische erworbene Resistenz ("systemic acquired resistance"; SAR) - ein Abwehrmechanismus bei verschiedenen Pflanze/Pathogen-Interaktionen - kann durch Applikation von endogener Botenstoffe wie Jasmonat (JA) oder

Salizylsäure (SA) vermittelt werden (Ward et al. (1991) Plant Cell 3:1085-1094; Uknas et al. (1992) Plant Cell 4(6):645-656). Ähnliche Effekte können auch durch synthetische Verbindungen wie 2,6-Dichlorisonikotinsäure (DCINA) oder Benzo(1,2,3)thiadiazol-5-thiocarbonsäure-S-methylester (BTH; Bion[®]) (Friedrich et al. (1996) Plant J 10(1):61-70; Lawton et al. (1996) Plant J 10:71-82) bewirkt werden. Auch die Expression der im Rahmen eines SAR hochregulierten "pathogenesis related" (PR) Proteine vermag zum Teil eine Pathogenresistenz zu bewirken.

In Gerste ist der Mlo-Locus als negativer Regulator der Pathogenabwehr beschrieben. Der Verlust oder Funktionsverlust ("loss-of-function") des Mlo-Gens bedingt eine erhöhte, rassen-unspezifische Resistenz gegen zahlreiche Mehltauisolate (Büsches R et al. (1997) Cell 88:695-705; Jorgensen JH (1977) Euphytica 26:55-62; Lyngkjaer MF et al. (1995) Plant Pathol 44:786-790). Das Mlo-Gen ist beschrieben (Büsches R et al. (1997) Cell 88:695-705; WO 98/04586; Schulze-Lefert P, Vogel J (2000) Trends Plant Sci. 5:343-348). Verschiedene Mlo-Homologe aus anderen Getreidearten wurden isoliert. Verfahren unter Verwendung dieser Gene zum Erzielen einer Pathogenresistenz sind beschrieben (WO 98/04586; WO 00/01722; WO 99/47552). Nachteilig ist, dass Mlo-defiziente Pflanzen auch in Abwesenheit eines Pathogens den o.g. Abwehrmechanismus initiieren, was sich in einem spontanen Absterben von Blattzellen äußert (Wolter M et al. (1993) Mol Gen Genet 239:122-128). Dadurch erleiden mlo-resistente Pflanzen eine Ertragseinbuße von ca. 5% (Jörgensen JH (1992) Euphytica 63: 141-152). Das spontane Absterben der Blattzellen bedingt ferner eine nachteilige Hypersuszeptibilität gegen nekrotrophe und hemibiotrophe Pathogene wie *Magnaporthe grisea* (*M. grisea*) oder *Cochliobolus sativus* (*Bipolaris sorokiniana*) (Jarosch B et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:508-514; Kumar J et al. (2001) Phytopathology 91:127-133).

Faktoren die einen der mlo-Resistenz vergleichbaren Effekt gegen nekrotrophe Pilze vermitteln, konnten bislang nicht identifiziert werden. Dies mag an dem besonderen Infektionsmechanismus der nekrotrophen Pilze liegen: Anstelle einer Appressorien-vermittelten Penetration infundieren sie zunächst die pflanzliche Wirtszelle mit Mykotoxinen und Enzymen, was zu einem Absterben der Zelle führt. Erst danach wird die Zelle penetriert (Shirasu K and Schulze-Lefert P (2000) Plant Mol Biol 44:371-385). Ähnliche Infektionsstrategien verfolgen

bakterielle Pathogene wie *Erwinia carotovora* (Whitehead NA et al. (2002) Antonie van Leeuwenhoek 81: 223-231). Eine Penetrationsresistenz mit Hilfe von Papillenbildung etc. stellt hier keine effiziente Abwehrstrategie dar.

5 Apoptose, auch als programmierter Zelltod bezeichnet, ist ein essentieller Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Gewebehomöostase und steht damit der Zellteilung als negativ regulierender Mechanismus gegenüber. Im vielzelligen Organismus
10 10 ist die Apoptose ein natürlicher Bestandteil der Ontogenese und u.a. an der Entwicklung der Organe und der Beseitigung von gealterten, infizierten oder mutierten Zellen beteiligt. Durch die Apoptose wird eine effiziente Elimination von unerwünschten Zellen erreicht. Eine Störung oder Inhibition der Apoptose trägt
15 15 zur Pathogenese verschiedener Erkrankungen bei, unter anderem zur Karzinogenese. Die Haupteffektoren der Apoptose sind Aspartat-spezifische Cystein-Proteasen, die sogenannten Caspasen. Ihre Aktivierung kann durch mindestens zwei Apoptose-Signalwege stattfinden: Zum einen durch die Aktivierung der TNF-
20 20 (Tumor Necrosis Factor) Rezeptorfamilie, zum anderen spielen Mitochondrien eine zentrale Rolle. Die Aktivierung des mitochondrialen Apoptose-Signalweges wird durch Proteine der Bcl-2-Familie reguliert. Diese Proteininfamilie besteht aus anti-apoptotischen sowie pro-apoptotischen Proteinen wie z.B. Bax. Im
25 25 Falle eines apoptotischen Stimulus findet eine allosterische Konformationsänderung des Bax-Proteins statt, welche zur Verankerung des Proteins in der mitochondrialen Außenmembran und seiner Oligomerisierung führt. Durch diese Oligomere werden pro-apoptotischen Moleküle aus den Mitochondrien ins Zytosol
30 30 freigesetzt, die eine apoptotische Signalkaskade und letztlich die Degradierung spezifischer zellulärer Substrate bedingen, was den Zelltod zur Folge hat. Der Bax Inhibitor-1 BI1 wurde über seine Eigenschaft isoliert, die pro-apoptotische Wirkung von BAX zu inhibieren (Xu Q & Reed JC (1998) Mol Cell 1(3): 337-346).
35 35 BI1 stellt ein hochkonservertes Protein dar. Es findet sich überwiegend als integraler Bestandteil intrazellulärer Membranen. BI1 interagiert mit bcl-2 und bcl-xL. Überexpression von BI1 in Säugetierzellen unterdrückt die pro-apoptotische Wirkung von BAX, Etoposid und Staurosporin, aber nicht von Fas-Antigen (Roth W and Reed JC (2002) Nat Med 8: 216-218). Die Inhibition von BI1 durch antisense-RNA hingegen induziert Apoptose (Xu Q & Reed JC (1998) Mol Cell 1(3):337-346). Die ersten pflanzlichen Homologen von BI1 wurden aus Reis und Arabidopsis isoliert (Kawai et al. (1999) FEBS Lett 464:143-147;

Sanchez et al (2000) Plant J 21:393-399). Diese pflanzlichen Proteine supprimieren BAX-induzierten Zelltod in Hefe. Die Aminosäure-Sequenzhomologie zu menschlichem BI1 beträgt ca. 45%. Das Arabidopsis-Homolog AtBI1 vermag in rekombinanten Pflanzen die pro-apoptotische Wirkung von BAX aus Maus zu supprimieren (Kawai-Yamada et al. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98(21):12295-12300). Das Reis (*Oryza sativa*) BI1-Homolog OsBI1 wird in allen pflanzlichen Geweben exprimiert (Kawai et al. (1999) FEBS Lett 464: 143-147). Beschrieben sind ferner BI1-Gene aus Gerste (Hordeum vulgare; GenBank Acc.-No.: AJ290421), Reis (GenBank Acc.-No.: AB025926), Arabidopsis (GenBank Acc.-No.: AB025927), Tabak (GenBank Acc.-No.: AF390556) und Raps (GenBank Acc.-No.: AF390555, Bolduc N et al. (2003) Planta 216:377-386). Die Expression von BI1 in Gerste wird infolge einer Infektion mit Mehltau hochreguliert (Hückelhoven R et al. (2001) Plant Mol Biol 47(6):739-748).

WO 00/26391 beschreibt die Überexpression der anti-apoptotischen Gene Ced-9 aus *C. elegans*, sFIAP aus *Spodoptera frugiperda*, bcl-2 aus Mensch sowie bcl-xl aus Huhn in Pflanzen zur Erhöhung der Resistenz gegen nekrotrophe bzw. hemibiotrophe Pilze. Pflanzliche BI1 Homologe werden nicht offenbart. Die Expression erfolgt unter Kontrolle konstitutiver Promotoren. Beschrieben ist ferner die Expression eines BI1 Proteins aus Arabidopsis unter dem starken konstitutiven 35S CaMV Promotor in Reiszellen und eine dadurch induzierte Resistenz gegen Zelltod induzierende Substanzen aus Magnaporthe grisea (Matsumura H et al. (2003) Plant J 33:425-434).

Überraschenderweise wurde im Rahmen dieser Erfindung gefunden, dass eine konstitutive Expression eines BI1-Proteins zwar eine Resistenz gegen nekrotrophe Pilze bedingt, jedoch ein Brechen der mlo-vermittelten Resistenz gegen obligat-biotrophen Echten Mehltau (siehe Vergleichsversuch 1) zur Folge hat. Dies stellt den wirtschaftlichen Nutzen der im Stand der Technik beschriebenen Verfahren in Frage.

Es bestand die Aufgabe, Verfahren zur Pathogenabwehr in Pflanzen bereitzustellen, die eine effiziente Abwehr pflanzlicher Pathogene (bevorzugt nekrotropher Pathogene) ermöglichen, ohne eine ggf. bestehende Resistenz gegen andere Pathogene (wie beispielsweise biotrophe Pathogene) zu brechen. Diese Aufgabe wird durch das erfindungsgemäße Verfahren gelöst.

Ein erster Gegenstand der Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen mindestens einen biotischen oder abiotischen Stref faktor in Pflanzen, wobei nachfolgende Arbeitsschritte umfaßt sind

5

- a) Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion mindestens eines Bax Inhibitor-1 (BI1) Proteins in mindestens einem pflanzlichen Gewebe mit der Maßgabe, dass die Expression in der Blattepidermis im wesentlichen unverändert bleibt oder reduziert wird, und
- b) Auswahl der Pflanzen, bei denen im Vergleich zur Ausgangspflanze eine Resistenz gegen mindestens einen biotischen oder abiotischen Stref faktor besteht oder erhöht ist.

Bevorzugt ist der biotische oder abiotische Stref faktor ein Pathogen, besonders bevorzugt ein Pathogen ausgewählt aus der Gruppe der nekrotrophen und hemibiotrophen Pathogene.

20

Unter der Epidermis versteht der Fachmann das vorherrschende Abschlussgewebe primärer oberirdischer Pflanzenteile, so des Sprosses, der Blätter, Blüten, Früchte und Samen. Nach außen scheiden die Epideriszellen eine wasserabstoßende Schicht, die Kutikula ab. Die Wurzeln sind von der Rhizodermis umgeben, welche der Epidermis in vieler Hinsicht ähnelt, jedoch auch markante Unterschiede zu ihr aufweist. Die Epidermis entsteht aus der äußersten Schicht des Apikalmeristems. Die Ableitung der Rhizodermis hingegen ist weniger klar. Je nach Art kann sie entwicklungsgeschichtlich entweder der Wurzelhaube oder der primären Rinde zugerechnet werden. Der Epidermis können zahlreiche Funktionen zugeschrieben werden: Sie bietet der Pflanze Schutz vor Austrocknung und regelt die Transpirationsrate. Sie schützt die Pflanze vor den verschiedensten chemischen und physikalischen Fremdeinflüssen sowie vor Tierfraß und Befall durch Parasiten. Sie ist am Gasaustausch, an der Sekretion bestimmter Stoffwechselprodukte und an der Absorption von Wasser beteiligt. In ihr sind Rezeptoren für Licht und mechanische Reize enthalten. Sie wirkt damit als ein Signalwandler zwischen Umwelt und Pflanze. Entsprechend den verschiedenen Funktionen enthält die Epidermis eine Anzahl unterschiedlich differenzierter Zellen. Hinzu kommen artspezifische Varianten und unterschiedliche Organisation der Epidermen in den einzelnen Teilen einer Pflanze. Im wesentlichen besteht sie aus drei Kategorien

von Zellen: den "eigentlichen" Epidermiszellen, den Zellen der Stomata (Spaltöffnungen) und den Trichomen (griech.: Trichoma, Haar), epidermalen Anhangsgebilden verschiedener Form, Struktur und Funktion.

- 5 Die "eigentlichen", d.h., die am wenigsten spezialisierten Epidermiszellen machen die Hauptmasse der Zellen des Abschlussgewebes aus. Sie sind in der Aufsicht entweder polygonal (von platten- oder tafelförmiger Gestalt) oder gestreckt. Die zwischen ihnen ausgebildeten Wände sind vielfach gewellt oder
10 gebuchtet. Wodurch diese Form während der Entwicklung induziert wird, ist unbekannt, die vorliegenden Hypothesen erklären den Sachverhalt nur unbefriedigend. Gestreckte Epidermiszellen findet man an Organen oder Organteilen, die selbst gestreckt sind, so z.B. an Stengeln, Blattstielen und Blattrippen sowie an
15 den Blättern der meisten Monokotyledonen. Ober- und Unterseite von Blattspreiten können von unterschiedlich strukturierten Epidermen bedeckt sein wobei sowohl die Form der Zellen, die Dicke der Wände als auch die Verteilung und Zahl spezialisierter Zellen (Stomata und/oder Trichome) pro Flächeneinheit variieren
20 kann. Große Variationen findet man auch innerhalb einzelner Familien, z. B. bei den Crassulaceen. Meist ist die Epidermis einschichtig, jedoch sind bei Arten aus mehreren Familien (Moraceae: hier die meisten Ficus-Arten, Piperaceae: Peperomia [Peperonie], Begoniaceae, Malvaceae u.a.) mehrschichtige
25 wasserspeichernde Epidermen nachgewiesen worden. Epidermiszellen sondern nach außen eine Cutinschicht (Kutikula) ab, die als ein ununterbrochener Film alle epidermalen Oberflächen überzieht. Sie kann entweder glatt oder durch Vorwölbungen, Leisten, Falten und Furchen strukturiert sein. Doch nicht immer beruht eine
30 durch Betrachtung der Oberfläche sichtbare Faltung der Kutikula auf der Ausbildung von Kutikularleisten. Es gibt durchaus Fälle, wo eine Kutikulafaltung nur der Ausdruck der darunterliegenden Ausstülpungen der Zellwand ist. Epidermale Anhangsgebilde verschiedener Form, Struktur und Funktion werden als Trichome
35 bezeichnet und hierin ebenfalls unter dem Begriff „Epidermis“ verstanden.. Sie treten als Schutz-, Stütz- und Drüsenhaare in Form von Schuppen, verschiedenen Papillen und bei Wurzeln als absorbierende Haare auf. An ihrer Bildung sind allein Epidermiszellen beteiligt. Oft entsteht ein Trichom aus nur einer solchen
40 Zelle, manchmal sind an der Entstehung mehrere beteiligt. Ebenfalls umfasst unter dem Begriff „Epidermis“ sind Papillen. Papillen sind Ausstülpungen der Epidermoberfläche. Das Lehrbuchbeispiel hierfür sind die Papillen auf Blütenoberflächen des Stiefmütterchens (*Viola tricolor*) sowie die Blattoberflächen

- vieler Arten im tropischen Regenwald. Sie verleihen der Oberfläche eine samtartige Konsistenz. Einige Zellen von Epidermen können als Wasserspeicher ausgebildet sein. Ein typisches Beispiel stellen die Blasenzellen an Oberflächen
- 5 vieler Mittagsblumenarten und anderer Sukkulanten dar. Bei manchen Pflanzen, z.B. bei der Glockenblume (*Campanula persicifolia*) sind die Außenwände der Epidermis linsenförmig verdickt.
- 10 Die Hauptmasse aller Gewebe bildet das Grundgewebe oder Parenchym. Zu den parenchymatischen Geweben gehört das Mesophyll, das in Blättern in Palisadenparenchym und Schwammparenchym differenziert sein kann.
- 15 Folglich versteht der Fachmann unter Mesophyll ein parenchymatisches Gewebe. Parenchymatische Zellen sind durchweg lebend, meist isodiametrisch, seltener gestreckt. Das Mark der Sprosse, die Speichergewebe der Früchte, Samen, der Wurzel und anderer unterirdischer Organe sind ebenso als Parenchyme zu betrachten
- 20 wie das Mesophyll.

Das Mesophyll ist in den Blättern der meisten Farne und Phanerogamen, besonders ausgeprägt bei den Dikotyledonen und vielen Monokotyledonen, in Palisaden- und Schwammparenchym untergliedert. Ein "typisches" Blatt ist dorsiventral gebaut. Das Palisadenparenchym liegt dabei meist an der Blattoberseite unmittelbar unter der Epidermis. Das Schwammparenchym füllt den darunterliegenden Raum aus. Es ist von einem voluminösen Interzellularsystem durchsetzt, dessen Gasraum über die Spaltöffnungen in direktem Kontakt zur Außenwelt steht.

Das Palisadenparenchym besteht aus langgestreckten, zylindrischen Zellen. Bei einigen Arten sind die Zellen irregulär, gelegentlich sind sie gegabelt (Y-förmig: Arm-palisadenparenchym). Solche Varianten kommen bei Farnen, Coniferen und einigen wenigen Angiospermen (z.B. bei einigen Ranunculaceen- und Caprifoliaceenarten [Beispiel: Holunder]) vor. Neben der eben beschriebenen, am weitesten verbreiteten Organisationsform sind die folgenden Varianten nachgewiesen worden:

Palisadenparenchym an der Blattunterseite. Besonders auffällig 40 bei Schuppenblättern. Beispiel: Lebensbaum (*Thuja*), sowie bei den Blättern des Bärlauchs (*Allium ursinum*).
Palisadenparenchym an beiden Blattseiten (Ober- und Unterseite). Häufig bei Pflanzen trockener Standorte (Xerophyten). Beispiel: Kompasspflanze (*Lactuca serriola*);

Ringförmig geschlossenes Palisadenparenchym: In zylindrisch organisierten Blättern und in Nadeln der Koniferen.

Die Variabilität der Schwammparenchymzellen und die Ausbildung des Schwammparenchyms selbst sind noch vielgestaltiger als die des Palisadenparenchyms. Es wird meist als Durchlüftungsgewebe bezeichnet, denn es enthält eine Vielzahl untereinander verbundener Interzellularen.

Das Mesophyll kann das so genannte Assimilationsgewebe umfassen, jedoch sind die Begriffe Mesophyll und Assimilationsgewebe nicht als Synonyme zu verwenden. Es gibt chloroplastenfreie Blätter, die sich in ihrem Aufbau nur unwesentlich von vergleichbaren, grünen Blättern unterscheiden. Folglich enthalten sie Mesophyll, doch eine Assimilation unterbleibt; umgekehrt findet eine Assimilation z.B. auch in Sproßabschnitten statt. Weitere Hilfsmittel zur Charakterisierung von Epidermis und Mesophyll findet der Fachmann z.B. in v. GUTTENBERG, H.: Lehrbuch der Allgemeinen Botanik. Berlin: Akademie-Verlag 1955 (5. Aufl.), HABERLANDT, G.: Physiologische Pflanzenanatomie. Leipzig: W. Engelmann 1924 (6. Aufl.); TROLL, W.: Morphologie der Pflanzen. Band 1: Vegetationsorgane. Berlin: Gebr. Borntraeger, 1937; TROLL, W.: Praktische Einführung in die Pflanzenmorphologie. Jena: VEB G. Thieme Verlag 1954/1957; TROLL, W., HÖHN, K.: Allgemeine Botanik. Stuttgart: F. Enke Verlag, 1973 (4. Aufl.).

In einer Ausführungsform wird die Epidermis biochemisch charakterisiert. Die Epidermis kann in einer Ausführungsform durch die Aktivität eines oder mehrerer der folgenden Promotoren gekennzeichnet werden:

- WIR5 (=GstA1), acc. X56012, Dudler & Schweizer, unveröff.
- GLP4, acc. AJ310534; Wei, Y.; Zhang, Z.; Andersen, C.H.; Schmelzer, E.; Gregersen, P.L.; Collinge, D.B.; Smedegaard-Petersen, V.; Thordal-Christensen, H. (1998) An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Molecular Biology* 36, 101-112.
- GLP2a, acc. AJ237942, Schweizer, P., Christoffel, A. and Dudler, R. (1999). Transient expression of members of the germin-like gene family in epidermal cells of wheat confers disease resistance, *Plant J* 20, 541-552.

- Prx7, acc. AJ003141, Kristensen BK, Ammitzböll H, Rasmussen SK & Nielsen KA. 2001. Transient expression of a vacuolar peroxidase increases susceptibility of epidermal barley cells
5 to powdery mildew. Molecular Plant Pathology, 2(6), 311-317
- GerA, acc. AF250933 ; Wu S, Druka A, Horvath H, Kleinhofs A, Kannangara G & von Wettstein D, 2000. Functional characterization of seed coat-specific members of the barley
10 germin gene family. Plant Phys Biochem 38, 685-698
- OsROC1, acc. AP004656
- RTBV, acc. AAV62708, AAV62707 ; Klöti, A, Henrich C, Bieri S, He X, Chen G, Burkhardt PK, Wünn J, Lucca, P, Hohn, T, Potrykus I & Fütterer J, 1999, Upstream and downstream sequence elements determine the specificity of the rice tungro bacilliform virus promoter and influence RNA production after transcription initiation. PMB 40, 249-266
20

In einer Ausführungsform wird die Epidermis dadurch gekennzeichnet, dass alle genannten Promoter in dem Gewebe oder der Zelle aktiv sind. In einer anderen Ausführungsform wird die Epidermis dadurch gekennzeichnet, dass nur ein Teil der Promotoren aktiv ist, z.B. 2, 3, 5 oder 7 oder mehr, mindestens jedoch einer der oben aufgezählten.
25

In einer Ausführungsform wird das Mesophyll biochemisch charakterisiert. Das Mesophyll kann in einer Ausführungsform durch die Aktivität eines oder mehrerer der folgenden Promotoren gekennzeichnet werden:
30

- PPCZm1 (=PEPC); Kausch,A.P., Owen,T.P., Zachwieja,S.J., Flynn, A.R. and Sheen,J. (2001) Mesophyll-specific, light and metabolic regulation of the C(4)PPCZm1 promoter in transgenic maize. Plant Mol. Biol. 45, 1-15
35
- Osrbcs, Kyozuka et al PlaNT Phys: 1993 102: Kyozuka J, McElroy D, Hayakawa T, Xie Y, Wu R & Shimamoto K. 1993. Light-regulated and cell-specific expression of tomato rbcsgusA and rice rbcsgusA fusion genes in transgenic rice. Plant Phys 102, 991-1000
40

- OsPPDK, acc. AC099041, unveröff.
- 5 - TaGF-2.8, acc. M63223; Schweizer,P., Christoffel,A. and Dudler,R. (1999). Transient expression of members of the germin-like gene family in epidermal cells of wheat confers disease resistance, Plant J 20, 541-552.
- 10 - TaFBPase, acc. X53957; unveröff.
- TaWIS1, acc. AF467542; US 200220115849
- HvBIS1, acc. AF467539; US 200220115849
- ZmMIS1, acc. AF467514; US 200220115849
- 15 - HvPR1a, acc. X74939 ; Bryngelsson et al. Molecular Plant-Microbe Interactions (1994)
- HvPR1b, acc. X74940; Bryngelsson et al. Molecular Plant-Microbe Interactions (1994)
- 20 - HvB1,3gluc; acc. AF479647; unveröff.
- HvPrx8, acc. AJ276227; Kristensen et al MPP 2001 (siehe oben)
- HvPAL, acc. X97313 ; Wei,Y.; Zhang,Z.; Andersen,C.H.; Schmelzer,E.; Gregersen,P.L.; Collinge,D.B.; Smedegaard-Petersen,V.; Thordal-Christensen,H. (1998) An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. Plant Molecular Biology 36, 101-112.
- 25 - In einer Ausführungsform wird das Mesophyll dadurch gekennzeichnet, dass alle genannten Promotoren in dem Gewebe oder der Zelle aktiv sind. In einer anderen Ausführungsform wird das Mesophyll dadurch gekennzeichnet, dass nur ein Teil der Promotoren aktiv ist, z.B. 2, 3, 5 oder 7 oder mehr, mindestens jedoch einer der oben aufgezählten.
- 30 - In einer Ausführungsform sind in einer erfindungsgemäß verwendeten oder hergestellten Pflanze oder in einer erfindungsgemäßen Pflanze in der Epidermis und im Mesophyll alle genannten Promotoren aktiv. In einer Ausführungsform sind nur ein Teil der genannten Promotoren aktiv, z.B. 2, 5, 7 oder mehr, mindestens ist jedoch einer der oben aufgezählten Promotoren jeweils aktiv.
- 35 -
- 40 -

- In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion des BI1-Proteins wurzel-, knollen- oder mesophyll-spezifisch, besonders bevorzugt mesophyll-spezifisch, beispielsweise durch rekombinante Expression einer für besagtes BI1-Protein kodierenden Nukleinsäuresequenz unter Kontrolle eines wurzel-, knollen- oder mesophyll-spezifischen Promotors, bevorzugt unter Kontrolle eines mesophyll-spezifischen Promotors.
- 10 In einer Ausführungsform wird wie hierin beschrieben, die Expression oder Funktion des erfindungsgemäßen Proteins bzw. des hierin charakterisierten BI-1 im Mesophyll einer Pflanze erhöht. Eine Erhöhung der Expression kann wie unten beschrieben erreicht werden. Unter Erhöhung der Expression oder Funktion wird hierin sowohl die Aktivierung oder Steigerung der Expression oder Funktion des endogenen Proteins einschließlich einer *de novo* Expression als auch eine Erhöhung oder Steigerung durch die Expression eines transgenen Proteins oder Faktors verstanden.
- 15 20 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform kann die Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion mindestens eines pflanzlichen BI1-Proteins kombiniert werden mit einem mlo-resistenten Phänotyp oder mit der Inhibierung oder Reduzierung im Vergleich zu einer Kontrollpflanze der Expression von MLO, RacB und/oder NaOx in der Pflanze oder einem Teil davon, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen und/oder mit der Erhöhung der Expression oder Funktion von PEN2 und/oder PEN1 in der Pflanze, z.B. konstitutiv, oder einem Teil davon, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen wird, mit der Maßgabe, dass die Expression eines pflanzlichen BI1-Proteins in der Blattepidermis im wesentlichen unverändert bleibt oder reduziert wird und so eine kombinierte Resistenz gegen sowohl nekrotrophe als auch biotrophe Pathogene erreicht wird.
- 25 30 35 40 In Gerste ist der Mlo-Locus als negativer Regulator der Pathogenabwehr beschrieben. Der Verlust oder Funktionsverlust ("loss-of-function") des Mlo-Gens bedingt eine erhöhte, rassen-unspezifische Resistenz gegen zahlreiche Mehltauisolate (Büsches R

et al. (1997) Cell 88:695-705; Jorgensen JH (1977) Euphytica 26:55-62; Lyngkjaer MF et al. (1995) Plant Pathol 44:786-790). Das Mlo-Gen ist beschrieben (Büsches R et al. (1997) Cell 88:695-705; WO 98/04586; Schulze-Lefert P, Vogel J (2000) Trends Plant Sci. 5:343-348). Verschiedene Mlo-Homologe aus anderen

5 Getreidearten wurden isoliert.

Ein mlo-resistenter Phänotyp kann wie im Stand der Technik beschrieben erreicht werden. Verfahren unter Verwendung dieser Gene zum Erzielen einer Pathogenresistenz sind beschrieben u.a. 10 in WO 98/04586; WO 00/01722; WO 99/47552.

Vorteilhaft kann in einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung die Aktivität, Expression oder Funktion von MLO, RacB und/oder NaOx in der Pflanze oder einem Teil davon, z.B. in 15 einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen inhibiert oder im Vergleich zu einer Kontrollpflanze oder einem Teil davon reduziert werden. Durch die Reduzierung der Aktivität oder Funktion von MLO, RacB und/oder NaOx in der Pflanze oder 20 einem Teil davon, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen wird vorzugsweise die Resistenz oder Widerstandskraft gegen biotrophe Pathogene bei erfindungsgemäß hergestellten Pflanzen erhöht. In Kombination mit einer Reduktion 25 oder Unterdrückung des nekrotischen Zelltods ist dies besonders vorteilhaft. Die Aktivität oder Funktion von MLO, RacB und/oder NaOX kann analog wie für MLO in WO 98/04586; WO 00/01722; WO 99/47552 und den weiteren unten genannten Schriften beschrieben reduziert oder inhibiert werden, deren Inhalt hiermit ausdrücklich als mit aufgenommen gilt, insbesondere um die Aktivität und Inhibierung von MLO zu beschreiben. Die Beschreibung der 30 genannten Schriften beschreibt Verfahren Methoden und besonders bevorzugte Ausführungsformen zur Erniedrigung oder Inhibierung der Aktivität oder Funktion von MLO, die Beispiele geben konkret an, wie dies ausgeführt werden kann.

35 Die Reduzierung der Aktivität oder Funktion, ggf. der Expression von RacB ist in der WO 2003020939 ausführlich beschrieben, die hiermit ausdrücklich mit als in die vorliegenden Beschreibung mit aufgenommen gilt. Die Beschreibung der genannten Schrift 40 beschreibt Verfahren und Methoden zur Erniedrigung oder Inhi-

bierung der Aktivität oder Funktion von BI-1, die Beispiele geben konkret an, wie dies ausgeführt werden kann. Besonders bevorzugt wird die Reduktion oder Inhibierung der Aktivität oder Funktion von RacB gemäß den in der WO 2003020939 besonders bevorzugten Ausführungsformen und den Beispielen und in den dort als besonders bevorzugt dargestellten Organismen durchgeführt, insbesondere in einer Pflanze oder einem Teil davon, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen. Die Reduzierung der Aktivität oder Funktion, ggf. der Expression von RacB ist in der WO 2003020939 ausführlich beschrieben. Der Fachmann findet in der WO 2003020939 die Sequenzen, die für RacB Proteine codieren und kann mit dem in der WO 2003020939 zur Verfügung gestellten Verfahren auch RacB identifizieren.

Die Reduzierung der Aktivität oder Funktion, ggf. der Expression von NaOX ist in der PCT/EP/03/07589 ausführlich beschrieben, die hiermit ausdrücklich mit als in die vorliegenden Beschreibung mit aufgenommen gilt.. Die Beschreibung der genannten Schrift beschreibt Verfahren und Methoden zur Erniedrigung oder Inhibierung der Aktivität oder Funktion von NaOx, die Beispiele geben konkret an, wie dies ausgeführt werden kann. Besonders bevorzugt wird die Reduktion oder Inhibierung der Aktivität oder Funktion von NaOx gemäß den in der PCT/EP/03/07589 besonders bevorzugten Ausführungsformen und den Beispielen und in den dort als besonders bevorzugt dargestellten Organismen durchgeführt insbesondere in einer Pflanze oder einem Teil davon, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen. Der Fachmann findet in der PCT/EP/03/07589 die Sequenzen, die für NaOx Proteine codieren und kann mit dem in der PCT/EP/03/07589 zur Verfügung gestellten Verfahren auch NaOx identifizieren.

Vorteilhaft kann in einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung die Aktivität, Expression oder Funktion von PEN1, PEN2 und/oder SNAP34 in der Pflanze, z.B. konstitutiv, oder einem Teil davon, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen erhöht werden. Die Erhöhung der Aktivität, die auch eine de novo Expression umschließt, von PEN1, PEN2 und/oder SNAP 34 in der Pflanze, z.B. konstitutiv, oder einem Teil davon,

z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermizzellen wird vorzugsweise die Resistenz oder Widerstandskraft gegen biotrophe Pathogene bei erfindungsgemäß hergestellten Pflanzen erhöhen. In Kombination mit einer Reduktion oder Unterdrückung des nekrotischen Zelltods ist dies besonders vorteilhaft. Die Erhöhung der Aktivität oder Funktion, ggf. der Expression von PEN2 ist in der WO03074688 ausführlich beschrieben und die hiermit ausdrücklich als in der vorliegenden Beschreibung mit aufgenommen gilt. Die Beschreibung der genannten Schrift beschreibt Verfahren und Methoden zur Erniedrigung oder Inhibierung der Aktivität oder Funktion von PEN2, die Beispiele geben konkret an, wie dies ausgeführt werden kann. Besonders bevorzugt wird die Reduktion oder Inhibierung der Aktivität oder Funktion von PEN2 gemäß den in der WO03074688 besonders bevorzugten Ausführungsformen und den Beispielen und in den dort als besonders bevorzugt dargestellten Organismen durchgeführt, insbesondere in Pflanzen, z.B. konstitutiv, oder einem Teil davon, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermizzellen.

Der Fachmann findet in der WO03074688 die Sequenzen, die für PEN2 Proteine codieren und kann mit dem in der WO03074688 zur Verfügung gestellten Verfahren auch PEN2 identifizieren. Die Expression von PEN1 und SNAP34 kann analog zu den in der WO03074688 beschriebenen Verfahren erhöht werden. Der Fachmann kann aufgrund des allgemeinen Fachwissens und des ihm bekannten Stands der Technik PEN1 und SNAP34-Nukleinsäuresequenzen und -Proteinsequenzen isolieren und überexprimieren. Seq ID NO.: 39 beschreibt die Nukleinsäuresequenz, die für PEN1 aus Gerste kodiert, die Proteinsequenz ist in Seq ID No.: 40 beschrieben. Seq ID NO.: 41 beschreibt die Nukleinsäuresequenz, die für PEN1 aus *Arabidopsis thaliana* kodiert, die Proteinsequenz ist in Seq ID No.: 42 beschrieben. PEN1 aus *Arabidopsis thaliana* ist veröffentlicht unter den accession numbers NM 202559 und NM 112015. Das Homolog aus Gerste wird als ROR2 offenbart in accession numbers AY246907 und AY246906. Es handelt sich um Mitglieder der recht großen Syntaxin-Proteinfamilie. Der Fachmann kann somit durch einfache Homologievergleiche weitere Syntaxin-Proteine identifizieren, die als potentielle Resistenzgene in dem erfindungsgemäßen Verfahren exprimiert werden.

Seq ID NO.: 43 beschreibt die Nukleinsäuresequenz, die für SNAP34 aus Gerste kodiert, die Proteinsequenz ist in Seq ID NO.: 44 beschrieben. Das SNAP-34 Homolog aus Gerste ist auch

veröffentlicht unter AY 247208 (SNAP-34). Homologe unbekannter Funktion, die eine Rolle in der Resistenz spielen könnten, sind veröffentlicht unter AY 247209 (SNAP-28) und AY 247210 (SNAP-25). Folgende *Arabidopsis*-Gene zeigen eine höhere Homologie zu 5 Gerste SNAP34 als Gersten SNAP-28 bzw. SNAP-25 zu SNAP-34 und können somit als potentielle Resistenz-vermittelnde Gene vorteilhaft überexprimiert werden:

- AAM 62553 - *Arabidopsis* SNAP25a
NP 200929 - *Arabidopsis* SNAP33b
10 NP 172842 - *Arabidopsis* SNAP30
NP 196405 - *Arabidopsis* SNAP29

Folglich betrifft die Erfindung auch eine Pflanze, in der mindestens weiterhin in der Epidermis ein Polypeptide überexprimiert wird, das codiert wird von einem Nukleinsäuremolekül, das 15 die in Seq. ID No.: 39, 41 oder 43 oder eine der in den genannten Datenbankveröffentlichungen gezeigten Sequenzen umfasst oder das die in Seq. ID No.: 40, 42 oder 44 gezeigte oder eine der in den genannten Datenbankveröffentlichungen gezeigten Aminosäuresequenzen umfasst, oder das ein funktionelles Äquivalent davon 20 ist oder das eine Homologie von mindestens 50 %, bevorzugt 70 %, mehr bevorzugt 80 %, noch mehr bevorzugt 90 % oder mehr zu den genannten Sequenzen auf Ebene des codierenden Nukleinsäuremoleküls oder bevorzugt auf Aminosäureebene hat, oder eine Pflanze, 25 in der konstitutiv oder in einem Teil, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen das vorhergehend charakterisierte Polypeptide aktiviert wird oder dessen Aktivität oder Funktion erhöht wird.

30 Eine Reduktion oder Expression oder Aktivität kann durch dem Fachmann geläufige Verfahren bewirkt werden, z.B. Mutagenese, z.B. EMS, ggf. Tilling, siRNA; Ribozyme, Silencing, Knockout, etc. Verfahren zur Reduzierung sind insbesondere besschrieben 35 in WO 2003020939, dessen Methoden an die hierin beschriebenen Sequenzen leicht angepasst werden können. Daher wird der Inhalt der WO 2003020939 explizit hierin mit aufgenommen.

40 Die Reduzierung oder Verminderung der Expression eines BI-1-Proteins, der BI-1-Aktivität oder der BI-1-Funktion kann auf vielfältige Art und Weise realisiert werden.

„Reduzierung“, „reduzieren“, „Verminderung“ oder „vermindern“ ist im Zusammenhang mit einem BI-1 Protein, einer BI-1 Aktivität

oder BI-1-Funktion weit auszulegen und umfasst die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität eines BI-1-Proteins.

- 5 Eine Verminderung im Sinne der Erfindung umfasst auch eine mengenmäßige Verringerung eines BI-1-Proteins bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen des BI-1-Proteins (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von BI-1-Aktivität bzw. BI-1-Funktion oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit des BI-1-Proteins).
10 Dabei wird die Expression eines bestimmten BI-1-Proteins oder die BI-1-Aktivität bzw. BI-1-Funktion in einer Zelle oder einem Organismus bevorzugt um mehr als 50 %, besonders bevorzugt um mehr als 80 %, ganz besonders bevorzugt um mehr als 90 % vermindert.
15 Erfindungsgemäß sind verschiedene Strategien zur Verminderung der Expression eines BI-1-Proteins, der BI-1-Aktivität oder BI-1-Funktion umfasst. Der Fachmann erkennt, dass eine Reihe verschiedener Methoden zur Verfügung stehen, um die Expression eines BI-1-Proteins, die BI-1-Aktivität oder die BI-1-Funktion in gewünschter Weise zu beeinflussen.

Eine Verminderung der BI-1-Aktivität oder der BI-1-Funktion wird bevorzugt durch eine verminderte Expression eines endogenen BI-1-Proteins erreicht.

Eine Verminderung der BI-1-Proteinmenge, BI-1-Aktivität oder BI-1-Funktion kann unter Verwendung nachfolgender Verfahren realisiert werden:

- 30 a) Einbringung einer doppelsträngigen BI-1 RNA-Nukleinsäuresequenz (BI-1-dsRNA) oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten;
35 b) Einbringung einer BI-1 antisense-Nukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die antisense-Nukleinsäuresequenz gegen ein BI-1-Gen (also genomische DNA-Sequenzen) oder ein BI-1-Gentranskript (also RNA-Sequenzen) gerichtet ist. Umfasst sind auch α -anomere Nukleinsäuresequenzen.

- c) Einbringung einer BI-1 antisense-Nukleinsäuresequenzen kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette.
- 5 d) Einbringung von BI-1 sense-Nukleinsäuresequenzen zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette.
- 10 e) Einbringung einer Nukleinsäuresequenz kodierend für dominant-negatives BI-1 Protein oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette.
- 15 f) Einbringung DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen BI-1 - Gene, -RNAs oder -Proteine oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette.
- g) Einbringung von den BI-1 RNA-Abbau bewirkende virale Nukleinsäuresequenzen und Expressionskonstrukten oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette.
- 20 h) Einbringung von Konstrukten zur Induktion einer homologen Rekombination an endogenen BI-1-Genen beispielsweise zur Erzeugung von Knockout-Mutanten.
- 25 i) Einführung von Mutationen in endogenen BI-1 Gene zur Erzeugung eines Funktionsverlustes (z.B. Generierung von Stopp-Kodons, Verschiebungen im Leseraster etc.)
wobei jedes der genannten Verfahren Epidermis-spezifisch durchgeführt werden muss, d.h. die Expression im Epidermisgewebe bleibt unverändert oder wird reduziert. Dabei kann jedes einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der BI-1-Expression, BI-1-Aktivität oder BI-1-Funktion im Sinne der Erfahrung bewirken. Auch eine kombinierte Anwendung ist denkbar. Weitere Methoden sind dem Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung des BI-1-Proteins, des Transports des BI-1-Proteins oder dessen mRNA, Hemmung der Ribosomenanlagerung, Hemmung des RNA-Spleißens, Induktion eines BI-1-RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung der Translations-elongation oder -termination umfassen.

Die Epidermis-sepzigische Reduktion kann z.B. durch eine transiente Anwendung der genannten Verfahren auf Epidermiszellen oder durch eine spezifische Transformation von im wesentlichen

nur Epidermiszellen oder durch eine Expressionskontrolle der aufgeführten Konstrukte unter einem Epidermisspezifischen Promoter oder sonstigen epidermisspezifischen Kontrollelement erfolgt.

5

Die einzelnen bevorzugten Verfahren seien infolge kurz beschrieben:

10

- a) Einbringung eines doppelsträngigen BI-1 RNA-Nukleinsäuremoleküls (BI-1-dsRNA)

15

20

25

30

35

40

Das Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA ("double-stranded RNA interference"; dsRNAi) ist vielfach in tierischen und pflanzlichen Organismen beschrieben (z.B. Matzke MA et al. (2000) Plant Mol Biol 43:401-415; Fire A. et al (1998) Nature 391:806-811; WO 99/32619; WO 99/53050; WO 00/68374; WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035; WO 00/63364). Auf die in den angegebenen Zitaten beschriebenen Verfahren und Methoden wird ausdrücklich Bezug genommen. Eine effiziente Gensuppression kann auch bei transienter Expression oder nach transienter Transformation beispielsweise infolge einer biolistischen Transformation gezeigt werden (Schweizer P et al. (2000) Plant J 2000 24: 895-903). dsRNAi-Verfahren beruhen auf dem Phänomen, dass durch gleichzeitiges Einbringen von komplementären Strang- und Gegenstrang eines Gentranskriptes eine hocheffiziente Unterdrückung der Expression des entsprechenden Gens bewirkt wird. Der bewirkte Phänotyp kommt dem einer entsprechenden knock-out Mutanten sehr ähnlich (Waterhouse PM et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95:13959-64).

Das dsRNAi-Verfahren hat sich bei der Verminderung der Expression als besonders effizient und vorteilhaft erwiesen. Wie u.a. in WO 99/32619 beschrieben sind dsRNAi-Ansätze klassischen antisense-Ansätzen deutlich überlegen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich daher auf doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA-Moleküle), die bei Einführung in eine Pflanze (oder eine davon abgeleitete Zelle, Gewebe, Organen, insbesondere Blattempidermis) die Verminderung eines BI-1 bewirken.

Das doppelsträngiges RNA-Molekül zur Verminderung der Expression eines BI-1 Proteins ist dadurch gekennzeichnet, dass

- 5 a) einer der beiden RNA Stränge im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil einer BI-1-Nukleinsäuresequenz, und
- 10 b) der jeweils andere RNA Strang im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil des identisch ist zu zumindest einem Teil des komplementären Stranges einer BI-1 Nukleinsäuresequenzges einer BI-1-Nukleinsäuresequenz.

15 In einer weiterhin bevorzugten Ausführungsform umfasst das doppelsträngige RNA-Molekül zur Verminderung der Expression eines BI-1 Proteins

- 20 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes einer Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI-1 Protein, und
- 25 b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementären ist.

30 In Bezug auf die doppelsträngigen RNA-Moleküle meint BI-1-Nukleinsäuresequenz bevorzugt eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 oder 38 oder ein funktionelles Äquivalent derselben.

35 „Im wesentlichen identisch“ meint, dass die dsRNA Sequenz auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu der BI-1 Zielsequenz aufweisen kann und dennoch eine effizient Verminderung der Expression bewirken. Bevorzugt beträgt die Homologie nach obiger Definition mindestens 50 % oder 75 %, bevorzugt mindestens 80 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "sense"-Strang einer inhibitorischen dsRNA und einem Teilstück einer BI-1 Nukleinsäuresequenz (bzw. zwischen dem "antisense"-Strang dem komplementären Strang einer BI-1 Nukleinsäuresequenz).

Die Länge des Teilabschnittes beträgt mindestens 10 Basen, bevorzugt mindestens 25 Basen, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 100 Basen, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder mindestens 300 Basen. Alternativ, kann eine "im wesentlichen identische" dsRNA auch als Nukleinsäuresequenz definiert werden, die befähigt ist, mit einem Teil eines BI-1 Gen-
transkriptes zu hybridisieren (z.B. in 400 mM NaCl, 40 mM
PIPER pH 6,4, 1 mM EDTA bei 50°C oder 70°C für 12 bis 16 h).
PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA bei 50°C oder 70°C für 12 bis 16 h).

"Im wesentlichen komplementär" meint, dass der "antisense"-RNA-Strang auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges aufweisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 80 %, bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "antisense"-RNA-Strang und dem Komplement des "sense"-RNA-Strangs.

"Teil des "sense"-RNA-Transkriptes" einer Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI-1 Protein oder ein funktionelles Äquivalent desselben meint Fragmente einer RNA oder mRNA transkribiert von einer für ein BI-1-Protein oder ein funktionelles Äquivalent desselben kodierenden Nukleinsäuresequenz, bevorzugt von einem BI-1-Gen. Dabei haben die Fragmente bevorzugt eine Sequenzlänge von mindestens 20 Basen, bevorzugt mindestens 50 Basen, besonders bevorzugt mindestens 100 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 200 Basen, am meisten bevorzugt mindestens 500 Basen.
Umfasst ist auch die vollständige transkribierte RNA oder mRNA.

Umfasst ist auch die Verwendung der erfindungsgemäßen dsRNA-Moleküle in den erfindungsgemäßen Verfahren zur Erzeugung einer Pathogenresistenz in Pflanzen.

Die dsRNA kann aus einem oder mehr Strängen polymerisierter Ribonukleotide bestehen. Es können ferner Modifikationen sowohl des Zucker-Phosphat-Gerüstes als auch der Nukleoside vorliegen. Beispielsweise können die Phosphodiesterbindungen der natürlichen RNA dahingehend modifiziert sein, dass sie zumindest ein Stickstoff oder Schwefel-Heteroatom umfassen. Basen können dahingehend modifiziert werden, dass die

Aktivität beispielsweise von Adenosindeaminase eingeschränkt wird. Solche und weitere Modifikationen sind weiter unten bei den Verfahren zur Stabilisierung von antisense-RNA beschrieben.

5

Natürlich können, um den gleichen Zweck zu erreichen, auch mehrere individuelle dsRNA Moleküle, die jeweils einen der oben definierten Ribonukleotidsequenzabschnitte umfassen, in die Zelle oder den Organismus eingebracht werden.

10

Die dsRNA kann enzymatisch oder ganz oder teilweise chemisch-synthetisch hergestellt werden.

15

Die doppelsträngige dsRNA Struktur kann ausgehend von zwei komplementären, separaten RNA-Strängen oder - bevorzugt - ausgehend von einem einzelnen, selbstkomplementären RNA-Strang gebildet werden.

20

25

30

35

Die doppelsträngige Struktur kann ausgehend von einem einzelnen, selbstkomplementären Strang oder ausgehend von zwei komplementären Strängen gebildet werden. Bei einem einzelnen, selbstkomplementären Strang, können "sense"- und "antisense"-Sequenz durch eine verbindende Sequenz ("Linker") verknüpft sein und beispielsweise eine Haarnadelstruktur ausbilden. Bevorzugt kann die verbindende Sequenz ein Intron sein, das nach Synthese der dsRNA herausgespleißt wird. Die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dsRNA kann weitere Elemente beinhalten, wie beispielsweise Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale. Sollen die zwei Stränge der dsRNA in einer Zelle oder Pflanze zusammengebracht werden, so kann dies auf verschiedene Art geschehen:

Die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dsRNA kann weitere Elemente beinhalten, wie beispielsweise Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale.

Sollen die zwei Stränge der dsRNA in einer Zelle oder Pflanze zusammengebracht werden, so kann dies auf verschiedene Art geschehen:

- 5 a) Transformation der Zelle oder Pflanze mit einem Vektor, der beide Expressionskassetten umfasst,
- 10 b) Kotransformation der Zelle oder Pflanze mit zwei Vektoren, wobei der eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.
- 15 c) Kreuzung von zwei Pflanzen, die mit jeweils einem Vektor transformiert wurden, wobei der eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

Die Bildung der RNA Duplex kann entweder außerhalb der Zelle oder innerhalb derselben initiiert werden. Wie in WO 99/53050 kann die dsRNA auch eine Haarnadelstruktur umfassen, indem "sense"- und "antisense"-Strang durch einen "Linker" (beispielsweise ein Intron) verbunden werden. Die selbstkomplementären dsRNA-Strukturen sind bevorzugt, da sie lediglich die Expression eines Konstruktes erfordern und die komplementären Stränge stets in einem äquimolaren Verhältnis umfassen.

Die Expressionskassetten kodierend für den "antisense"- oder "sense"-Strang einer dsRNA oder für den selbstkomplementären-Strang der dsRNA, werden bevorzugt in einen Vektor insertiert und mit den unten beschriebenen Verfahren stabil (beispielsweise unter Verwendung von Selektionsmarkern) in das Genom einer Pflanze insertiert unter Kontrolle eines Epidermisspezifischen Promoters wie hierin aufgeführt, um eine dauerhafte Expression der dsRNA in der Epidermis zu gewährleisten.

Die dsRNA kann unter Verwendung einer Menge eingeführt werden, die zumindest ein Kopie pro Zelle ermöglicht. Höhere Mengen (z.B. mindestens 5, 10, 100, 500 oder 1000 Kopien pro Zelle) können ggf. eine effizientere Verminderung bewirken.

Wie bereits beschrieben, ist eine 100%ige Sequenzidentität zwischen dsRNA und einem BI-1 Gentranskript oder dem Gentranskript eines funktionell äquivalenten Gens nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente Verminderung der BI-1 Expression zu bewirken. Demzufolge besteht der Vorteil, dass das Verfahren tolerant ist gegenüber Sequenzabweichungen, wie sie infolge genetischer Mutationen, Polymorphismen oder evolutionärer Divergenzen vorliegen können. So ist es beispielsweise möglich mit der dsRNA, die ausgehend von der BI-1 Sequenz des einen Organismus generiert wurde, die BI-1 Expression in einem anderen Organismus zu unterdrücken. Die hohe Sequenzhomologie zwischen den BI-1 Sequenzen aus Reis, Mais und Gerste lässt auf einen hohen Konservierungsgrad dieses Proteins innerhalb von Pflanzen schließen, so dass die Expression einer dsRNA abgeleitet von einer der offebarten BI-1 Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 3 oder 5 auch einen vorteilhaften Effekt in anderen Pflanzenarten haben dürfte.

Auch ist es aufgrund der hohen Homologie zwischen den einzelnen BI-1-Proteinen und ihren funktionellen Äquivalenten möglich mit einer einzigen dsRNA, die ausgehend von einer bestimmten BI-1-Sequenz eines Organismus generiert wurde, die Expression weiterer homologer BI-1-Proteine und/oder deren funktioneller Äquivalente des gleichen Organismus oder aber auch die Expression von BI-1-Proteinen in anderen verwandten Arten zu unterdrücken. Zu diesem Zweck umfasst die dsRNA bevorzugt Sequenzbereich von BI-1-Gentranskripten, die konservierten Bereichen entsprechen. Besagte konservierte Bereiche können aus Sequenzvergleichen leicht abgeleitet werden.

Die dsRNA kann entweder *in vivo* oder *in vitro* synthetisiert werden. Dazu kann eine DNA-Sequenz kodierend für eine dsRNA in eine Expressionskassette unter Kontrolle mindestens eines genetischen Kontrollementes (wie beispielsweise Promotor, Enhancer, Silencer, Splice-Donor oder -Akzeptor, Polyadenylierungssignal) gebracht werden, wobei eine Epidermis-spezifische Expression der dsRNA angestrebt wird. Entsprechend vorteilhafte Konstruktionen sind weiter unten beschrieben. Eine Polyadenylierung ist nicht erforderlich, ebenso müssen keine Elemente zur Initiierung einer Translation vorhanden sein.

Eine dsRNA kann chemisch oder enzymatisch synthetisiert werden. Dazu können zelluläre RNA Polymerasen oder Bakteriophage RNA Polymerasen (wie z.B. T3-, T7- oder SP6 RNA-Polymerase) verwendet werden. Entsprechende Verfahren zu in vitro Expression von RNA sind beschrieben (WO 97/32016; US 5,593,874; US 5,698,425, US 5,712,135, US 5,789,214, US 5,804,693). Eine chemisch oder enzymatisch in vitro synthetisierte dsRNA kann vor der Einführung in eine Zelle, Gewebe oder Organismus aus dem Reaktionsgemisch beispielsweise durch Extraktion, Präzipitation, Elektrophorese, Chromatographie oder Kombinationen dieser Verfahren ganz oder teilweise aufgereinigt werden. Die dsRNA kann unmittelbar in die Zelle eingeführt werden oder aber auch extrazellulär (z.B. in den interstitialen Raum) appliziert werden.

Bevorzugt wird die Pflanze jedoch stabil mit einem Expressionskonstrukt, das die Expression der dsRNA in der Epidermis realisiert, transformiert. Entsprechende Verfahren sind weiter unten beschrieben.

b) Einbringung eines BI-1 antisense-Nukleinsäuremoleküls

Verfahren zur Suppression eines bestimmten Proteins durch Verhinderung der Akkumulation seiner mRNA durch die "antisense"-Technologie sind vielfach - auch in Pflanzen - beschrieben (Sheehy et al. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85: 8805-8809; US 4,801,340; Mol JN et al. (1990) FEBS Lett 268(2):427-430). Das antisense Nukleinsäuremolekül hybridisiert bzw. bindet mit der zellulären mRNA und/oder genomischen DNA kodierend für das zu supprimierende BI-1-Zielprotein. Dadurch wird die Transkription und/oder Translation des Zielproteins unterdrückt. Die Hybridisierung kann auf konventionelle Art über die Bildung einer stabilen Duplex oder - im Fall von genomischer DNA - durch Bindung des antisense Nukleinsäuremoleküls mit der Duplex der genomischen DNA durch spezifische Wechselwirkung in der großen Furche der DNA-Helix entstehen. Das Einbringen erfolgt so, dass die BI-1-Menge oder Funktion spezifisch in der Epidermis reduziert wird, z.B. durch transiente Transformation der Epidermis oder stabile Transformation unter Kontrolle der Expression eines entsprechenden Konstruktes mit einem Epidermis-spezifischen Promoters.

Eine antisense Nukleinsäuresequenz geeignet zur Verminderung eines BI-1-Proteins kann unter Verwendung der für dieses Protein kodierenden Nukleinsäuresequenz, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 oder 38 oder 5 kodierend für ein funktionelles Äquivalent derselben nach den Basenpaarregeln von Watson und Crick abgeleitet werden. Die antisense Nukleinsäuresequenz kann zu der gesamten transkribierten mRNA des besagten Proteins komplementär 10 sein, sich auf die kodierende Region beschränken oder nur aus einem Oligonukleotid bestehen, das zu einem Teil der kodierenden oder nicht-kodierenden Sequenz der mRNA 15 komplementär ist. So kann das Oligonukleotid beispielsweise komplementär zu der Region sein, die den Translationsstart für das besagte Protein umfasst. Antisense-Nukleinsäure-sequenzen können eine Länge von zum Beispiel 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Nukleotide haben, können aber auch länger sein und mindestens 100, 200, 500, 1000, 2000 20 oder 5000 Nukleotide umfassen. Antisense-Nukleinsäure-sequenzen können rekombinant exprimiert oder chemisch bzw. enzymatisch unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren synthetisiert werden. Bei der chemischen Synthese können natürlich oder modifizierte Nukleotide verwendet werden. Modifizierte Nukleotide können der antisense 25 Nukleinsäuresequenz eine erhöhte biochemische Stabilität verleihen und zu einer erhöhten physikalischen Stabilität der Duplex gebildet aus antisense-Nukleinsäuresequenz und sense-Zielsequenz führen. Verwendet werden können beispielsweise Phosphorothioatderivative und Acridin-substituierte 30 Nukleotide wie 5-Fluorouracil, 5-Bromouracil, 5-Chlorouracil, 5-Iodouracil, Hypoxanthin, Xanthin, 4-Acetylcytosin, 5-(Carboxyhydroxymethyl)uracil, 5-Carboxymethylaminomethyl-2-thiouridin, 5-Carboxymethylaminomethyluracil, Dihydro-uracil, β-D-Galactosylqueosin, Inosine, N6-Isopentenyladenin, 1-Methylguanin, 1-Methylinosin, 2,2-Dimethylguanin, 35 2-Methyladenin, 2-Methylguanin, 3-Methylcytosin, 5-Methylcytosin, N6-Adenin, 7-Methylguanin, 5-Methylaminomethyluracil, 5-Methoxyaminomethyl-2-thiouracil, β-D-mannosylqueosin, 5'-Methoxycarboxymethyluracil, 5-Methoxyuracil, 2-Methylthio-N6-isopentenyladenin, Uracil-5-oxyessigsäure, 40 Pseudouracil, Queosine, 2-Thiocytosin, 5-Methyl-2-thiouracil, 2-Thiouracil, 4-Thiouracil, 5-Methyluracil, Uracil-5-oxyessigsäuremethylester, Uracil-5-oxyessigsäure, 5-Meth-

y1-2-thiouracil, 3-(3-Amino-3-N-2-carboxypropyl)uracil und 2,6-Diaminopurin.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die Expression eines BI-1-Proteins durch Nukleotidsequenzen 5 inhibiert werden, die komplementär zu der regulatorischen Region eines BI-1-Gens (z.B. einem BI-1 Promoter und/oder Enhancer) sind und triple-helikale Strukturen mit der doppelten DNA-Doppelhelix ausbilden, so dass die Transkription 10 des BI-1-Gens vermindert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Helene C (1991) Anticancer Drug Res 6(6):569-84; Helene C et al. (1992) Ann NY Acad Sci 660:27-36; Maher LJ (1992) Bioassays 14(12):807-815).

In einer weiteren Ausführungsform kann das antisense 15 Nukleinsäuremolekül eine α -anomere Nukleinsäure sein. Derartige α -anomere Nukleinsäuremoleküle bilden spezifische doppelsträngige Hybride mit komplementärer RNA in denen - im Unterschied zu den konventionellen β -Nukleinsäuren - die beiden Stränge parallel zueinander verlaufen (Gautier C 20 et al. (1987) Nucleic Acids Res 15:6625-6641). Das antisense Nukleinsäuremolekül kann ferner auch 2'-O-Methylribonukleotide (Inoue et al. (1987) Nucleic Acids Res 15:6131-6148) oder chimäre RNA-DNA Analoge beinhalten (Inoue et al. (1987) FEBS Lett 215:327-330).

25

- c) Einbringung eines BI-1 antisense-Nukleinsäuremoleküls kombiniert mit einem Ribozym

Vorteilhaft kann die oben beschriebene antisense-Strategie 30 mit einem Ribozym-Verfahren gekoppelt werden. Katalytische RNA-Moleküle oder Ribozyme können an jede beliebige Ziel-RNA angepasst werden und spalten das Phosphodiester-Gerüst an spezifischen Positionen, wodurch die Ziel-RNA funktionell deaktiviert wird (Tanner NK (1999) FEMS Microbiol Rev 23(3):257-275). Das Ribozym wird dadurch nicht selber modifiziert, sondern ist in der Lage, weitere Ziel-RNA-Moleküle 35 analog zu spalten, wodurch es die Eigenschaften eines Enzyms erhält. Der Einbau von Ribozymsequenzen in "antisense"-RNAs verleiht eben diesen "antisense"-RNAs diese enzymähnliche, 40 RNA-spaltende Eigenschaft und steigert so deren Effizienz bei der Inaktivierung der Ziel-RNA. Die Herstellung und Verwendung entsprechender Ribozym-"antisense"-RNA-Moleküle ist beispielsweise beschrieben bei Haseloff et al. (1988) Nature 334: 585-591.

Auf diese Art können Ribozyme (z.B. "Hammerhead"-Ribozyme; Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591) verwendet werden, um die mRNA eines zu supprimierenden Enzyms - z.B. BI-1 - katalytisch zu spalten und die Translation zu verhindern. Die Ribozym-Technologie kann die Effizienz einer antisense-Strategie erhöhen. Verfahren zur Expression von Ribozymen zur Verminderung bestimmter Proteine sind beschrieben in (EP 0 291 533, EP 0 321 201, EP 0 360 257). In pflanzlichen Zellen ist eine Ribozym-Expression ebenfalls beschrieben (Steinecke P et al. (1992) EMBO J 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) Mol Gen Genet. 250(3):329-338). Geeignete Zielsequenzen und Ribozyme können zum Beispiel wie bei "Steinecke P, Ribozymes, Methods in Cell Biology 50, Galbraith et al. eds, Academic Press, Inc. (1995), S. 449-460" beschrieben, durch Sekundärstrukturberechnungen von Ribozym- und Ziel-RNA sowie durch deren Interaktion bestimmt werden (Bayley CC et al. (1992) Plant Mol Biol. 18(2):353-361; Lloyd AM and Davis RW et al. (1994) Mol Gen Genet. 242(6):653-657). Beispielsweise können Derivate der Tetrahymena L-19 IVS RNA konstruiert werden, die komplementäre Bereiche zu der mRNA des zu supprimierenden BI-1 Proteins aufweisen (siehe auch US 4,987,071 und US 5,116,742). Alternativ können solche Ribozyme auch über einen Selektionsprozess aus einer Bibliothek diverser Ribozyme identifiziert werden (Bartel D und Szostak JW (1993) Science 261:1411-1418). Die Expression erfolgt z.B. unter Kontrolle eines Epidermis-spezifischen Promoters.

30 d) Einbringung eines BI-1 sense-Nukleinsäuremoleküls zur Induktion einer Kosuppression

Die Epidermis-spezifische Expression eines BI-1 Nukleinsäuremoleküls in sense-Orientierung kann zu einer Kosuppression des entsprechenden homologen, endogenen Gens in Epidermiszellen führen. Die Expression von sense-RNA mit Homologie zu einem endogenen Gen kann die Expression desselben vermindern oder ausschalten, ähnlich wie es für antisense Ansätze beschrieben wurde (Jorgensen et al. (1996) Plant Mol Biol 31(5):957-973; Goring et al. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:1770-1774; Smith et al. (1990) Mol Gen Genet 224:447-481; Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; Van der Krol et al. (1990) Plant Cell 2:291-299). Dabei kann das eingeführte Konstrukt das zu vermindernde, homologe Gen

ganz oder nur teilweise repräsentieren. Die Möglichkeit zur Translation ist nicht erforderlich. Die Anwendung dieser Technologie auf Pflanzen ist beispielsweise beschrieben bei Napoli et al. (1990) The Plant Cell 2: 279-289 und in 5 US 5,034,323.

Bevorzugt wird die Kosuppression unter Verwendung einer Sequenz realisiert, die im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend 10 für ein BI-1-Protein oder ein funktionelles Äquivalent desselben, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 oder 38 oder der Nukleinsäuresequenz 20 kodierend für ein funktionelles Äquivalent derselben.

15 e) Einbringung von Nukleinsäuremolekülen kodierend für ein dominant-negatives BI-1 Protein

Die Funktion oder Aktivität eines BI-1 Protein kann effektiv 20 auch durch Epidermis-spezifische Expression einer dominant-negativen Variante dieses BI-1-Proteins in Epidermiszellen reduziert werden. Verfahren zur Verminderung der Funktion bzw. Aktivität eines Proteins mittels Koexpression seiner dominant-negativen Form sind dem Fachmann bekannt (Lagna G 25 und Hemmati-Brivanlou A (1998) Current Topics in Developmental Biology 36:75-98; Perlmutter RM und Alberola-Ila J (1996) Current Opinion in Immunology 8(2):285-90; Sheppard D (1994) American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology. 11(1):1-6; Herskowitz I (1987) Nature 30 329(6136):219-22).

Die bevorzugt zu mutierende Aminosäure in BI-1 Homologen aus anderen Arten kann beispielsweise mittels Computer-unterstütztem Vergleich ("Alignment") ermittelt werden. Diese 35 Mutationen zum Erreichen einer dominant-negativen BI-1 Variante werden bevorzugt auf der Ebene der Nukleinsäuresequenz kodierend für BI-1 Proteine durchgeführt. Eine entsprechende Mutation kann beispielsweise durch PCR vermittelte in vitro Mutagenese unter Verwendung entsprechender Oligonukleotidprimer, durch welche die gewünschte Mutation 40 eingeführt wird, realisiert werden. Dazu werden dem Fachmann geläufige Verfahren verwendet. Beispielsweise kann zu diesem Zweck der "LA PCR in vitro Mutagenesis Kit" (Takara Shuzo, Kyoto) verwendet werden. Ein Verfahren zur Herstellung einer

dominant-negativen Variante eines RacB-Proteins aus Mais ist auch in WO 00/15815 (Beispiel 4, S. 69) beschrieben.

Die Expression einer solchen Mutante kann dann z.B. unter 5 Kontrolle eines Epidermis-spezifischen Promoters erfolgen.

- f) Einbringung DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen BI-1 Gene, -RNAs oder Proteine

10 Eine Verminderung einer BI-1 Genexpression in der Epidermis ist auch mit spezifischen DNA-bindenden Faktoren z.B. mit Faktoren vom Typus der Zinkfingertranskriptionsfaktoren möglich. Diese Faktoren lagern sich an die genomische Sequenz des endogenen Zielgens, bevorzugt in den regulatorischen Bereichen, an und bewirken eine Repression des endogenen Gens. Die Verwendung eines solchen Verfahrens ermöglicht die Verminderung der Expression eines endogenen BI-1 Gens, ohne dass dessen Sequenz gentechnisch manipuliert werden muss. Entsprechende Verfahren zur Herstellung entsprechender Faktoren sind beschrieben (Dreier B et al.

20 (2001) J Biol Chem 276(31):29466-78; Dreier B et al. (2000) J Mol Biol 303(4):489-502; Beerli RR et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97 (4):1495-1500; Beerli RR et al. (2000) J Biol Chem 275(42):32617-32627; Segal DJ and Barbas CF 3rd (2000) Curr Opin Chem Biol 4(1):34-39; Kang JS and Kim JS (2000) J Biol Chem 275(12):8742-8748; Beerli RR et al.

25 (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(25):14628- 14633; Kim JS et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(8):3616 -3620; Klug A (1999) J Mol Biol 293(2):215-218; Tsai SY et al. (1998) Adv Drug Deliv Rev 30(1-3):23-31; Mapp AK et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97(8):3930-3935; Sharrocks AD et al.

30 (1997) Int J Biochem Cell Biol 29(12):1371-1387; Zhang L et al. (2000) J Biol Chem 275(43):33850-33860).

35 Die Selektion dieser Faktoren kann unter Verwendung eines beliebigen Stückes eines BI-1-Gens erfolgen. Bevorzugt liegt dieser Abschnitt im Bereich der Promotorregion. Für eine Genunterdrückung kann er aber auch im Bereich der kodierenden Exons oder Introns liegen. Die entsprechenden Abschnitte sind für den Fachmann mittels Datenbankabfrage aus der Genbank oder - ausgehend von einer BI-1 cDNA, deren Gen nicht in der Genbank vorhanden ist, durch Durchmusterung einer genomischen Bibliothek nach korrespondierenden genomischen Klonen erhältlich. Die dazu erforderlichen Verfahren sind

dem Fachmann geläufig, z.B. können diese Faktoren unter Kontrolle eines Epidermis-spezifischen Promoters oder anderer eine Epidermis-spezifische Expression vermittelnden Faktoren exprimiert werden.

5 Ferner können Faktoren in eine Zelle eingebracht werden, die das BI-1 Zielprotein selber inhibieren. Die proteinbindenden Faktoren können z.B. Aptamere (Famulok M und Mayer G (1999) Curr Top Microbiol Immunol 243:123-36) oder Antikörper bzw.
10 Antikörperfragmente oder einzelkettige Antikörper sein. Die Gewinnung dieser Faktoren ist beschrieben und dem Fachmann bekannt. Beispielsweise wurde ein cytoplasmatischer scFv Antikörper eingesetzt, um die Aktivität des Phytochrom A Proteins in gentechnisch veränderten Tabakpflanzen zu
15 modulieren (Owen M et al. (1992) Biotechnology (N Y) 10(7):790-794; Franken E et al. (1997) Curr Opin Biotechnol 8(4):411-416; Whitelam (1996) Trend Plant Sci 1:286-272).

20 Die Genexpression kann auch durch maßgeschneiderte, niedermolekulare synthetische Verbindungen unterdrückt werden, beispielsweise vom Polyamid-Typ (Dervan PB und Bürli RW (1999) Current Opinion in Chemical Biology 3:688-693; Gottesfeld JM et al. (2000) Gene Expr 9(1-2):77-91). Diese Oligomere bestehen aus den Bausteinen 3-(Dimethylamino)-
25 propylamin, N-Methyl-3-hydroxypyrrrol, N-Methylimidazol und N-Methylpyrrole und können an jedes Stück doppelsträngiger DNA so angepasst werden, dass sie sequenzspezifisch in die große Furche binden und die Expression der dortigen Gensequenzen blockieren. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (siehe unter anderem Bremer RE et al. (2001) Chem Bioorg Med Chem. 9(8):2093-103; Ansari AZ et al. (2001) Chem Biol. 8(6):583-92; Gottesfeld JM et al. (2001) J Mol Biol. 309(3):615-29; Wurtz NR et al. (2001) Org Lett 3(8):1201-3; Wang CC et al. (2001) Bioorg Med Chem 9(3):653-7; Urbach AR
30 und Dervan PB (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98(8):4343-8; Chiang SY et al. (2000) J Biol Chem. 275(32):24246-54).

40 Alle genannten Faktoren werden Epidermis-spezifisch eingebracht, um eine Reduktion der BI-1-Aktivität lediglich in Epidermiszellen zu gewährleisten, z.B. durch Expression unter Kontrolle eines Epidermis-spezifischen Promoters, wie sie z.B. oben genannt sind.

- g) Einbringung von den BI-1 RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuremolekülen und entsprechenden Expressionskonstrukten
- 5 Die BI-1 Expression in der Epidermis kann effektiv auch durch Induktion des spezifischen BI-1 RNA-Abbaus in Epidermiszellen mit Hilfe eines viralen Expressionssystems (Amplikon) (Angell, SM et al. (1999) Plant J. 20(3):357-362) realisiert werden. Diese Systeme - auch als "VIGS" (viral induced gene silencing) bezeichnet - bringen Nukleinsäuremoleküle mit Homologie zu den zu supprimierenden Transkripten mittels viraler Vektoren in die Pflanze ein. Die Transkription wird sodann - vermutlich mediert durch pflanzliche Abwehrmechanismen gegen Viren - abgeschaltet. Entsprechende Techniken und Verfahren sind beschrieben (Ratcliff F et al. (2001) Plant J 25(2):237-45; Fagard M und Vaucheret H (2000) Plant Mol Biol 43(2-3):285-93; Anandalakshmi R et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(22):13079-84; Ruiz MT (1998) Plant Cell 10(6): 937-46).
- 20 h) Einbringung von Konstrukten zur Induktion einer homologen Rekombination an endogenen BI-1-Genen beispielsweise zur Erzeugung von Knockout-Mutanten
- 25 Zur Herstellung eines homolog rekombinanten Organismus mit verminderter BI-1-Aktivität in den Epidermiszellen verwendet man beispielsweise ein Nukleinsäurekonstrukt, das zumindest einen Teil eines endogenen BI-1 Gens enthält, das durch eine Deletion, Addition oder Substitution mindestens eines Nukleotids so verändert wird, so dass die Funktionalität vermindert oder gänzlich aufgehoben wird. Die Veränderung kann auch die regulativen Elemente (z.B. den Promotor) des Gens betreffen, so dass die kodierende Sequenz unverändert bleibt, eine Expression (Transkription und/oder Translation) jedoch unterbleibt und vermindert wird.
- 30 35 Bei der konventionellen homologen Rekombination ist die veränderte Region an ihrem 5'- und 3'-Ende von weiteren Nukleinsäuresequenzen flankiert, die eine ausreichende Länge für die Ermöglichung der Rekombination aufweisen müssen. Die Länge liegt in der Regel in einem Bereich von mehreren einhundert Basen bis zu mehreren Kilobasen (Thomas KR und Capecchi MR (1987) Cell 51:503; Strepp et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(8):4368-4373). Für die homologe

Rekombination wird der Wirtsorganismus - zum Beispiel eine Pflanze - mit dem Rekombinationskonstrukt unter Verwendung der unten beschriebenen Verfahren transformiert und erfolgreich rekombinierte Klone unter Verwendung zum Beispiel einer Antibiotika- oder Herbizidresistenz selektioniert.

5

Homologe Rekombination ist ein relativ seltenes Ereignis in höheren Eukaryoten, vor allem in Pflanzen. Zufällige Integrationen in das Wirtsgenom überwiegen. Eine Möglichkeit die zufällig integrierten Sequenzen zu entfernen und so Zellklone mit einer korrekten homologen Rekombination anzureichern, besteht in der Verwendung eines sequenzspezifischen Rekombinationssystems wie in US 6,110,736 beschrieben, durch welche unspezifisch integrierte Sequenzen wieder deletiert werden können, was die Selektion erfolgreich über homologe Rekombination integrierter Ereignisse erleichtert. Eine Vielzahl von sequenzspezifischen Rekombinationssystemen kann verwendet werden, beispielhaft sind das Cre/lox-System des Bacteriophagen P1, das FLP/FRT System der Hefe, die Gin Rekombinase des Mu Phagen, die Pin Rekombinase aus E. coli und das R/RS System des pSR1 Plasmids genannt. Bevorzugt sind das Bacteriophagen P1 Cre/lox und das Hefe FLP/FRT System. Das FLP/FRT und cre/lox Rekombinasesystem wurde bereits in pflanzlichen Systemen angewendet (Odell et al. (1990) Mol Gen Genet 223: 369-378). Die Epidermis-spezifische Rekombination kann z.B. dadurch gewährleistet werden, dass die Expression der die Rekombination vermittelnden Systeme und Enzyme unter Kontrolle eines Epidermis-spezifischen Promoters erfolgt.

30

- i) Einführung von Mutationen in endogene BI-1 Gene zur Erzeugung eines Funktionsverlustes (z.B. Generierung von Stopp-Kodons, Verschiebungen im Leseraster etc.)

35

Weitere geeignete Methoden zur Verminderung der BI-1-Aktivität sind die Einführung von Nonsense-Mutationen in endogene BI-1 Gene zum Beispiel mittels Einführung von RNA/DNA-Oligonukleotiden in die Epidermiszellen (Zhu et al. (2000) Nat Biotechnol 18(5):555-558) sowie die Generierung von Knock-out-Mutanten mit Hilfe von z.B. T-DNA-Mutagenese (Koncz et al. (1992) Plant Mol Biol 20(5):963-976), ENU-(N-Ethyl-N-nitrosoharnstoff) - Mutagenese oder homologer Rekombination (Hohn B und Puchta (1999) H Proc Natl Acad Sci USA 96:8321-8323.). Punktmutationen können auch mittels DNA-RNA Hybriden

40

erzeugt werden, die auch als "chimeraplasty" bekannt sind (Cole-Strauss et al. (1999) Nucl Acids Res 27(5):1323-1330; Kmiec (1999) Gene therapy American Scientist 87(3):240-247).

- 5 Die Methoden der dsRNAi, der Kosuppression mittels sense-RNA und der "VIGS" ("virus induced gene silencing") werden auch als "post-transcriptional gene silencing" (PTGS) bezeichnet. PTGS-Verfahren wie auch die Verminderung der BI-1-Funktion oder Aktivität mit dominant-negativen BI-1-Varianten sind besonders
10 vorteilhaft, weil die Anforderungen an die Homologie zwischen dem zu supprimierenden endogenem Gen und der transgen exprimierten sense- oder dsRNA-Nukleinsäuresequenz (bzw. zwischen dem endogenen Gen und seiner dominant-negativen Variante) geringer sind als beispielsweise bei einem klassischen antisense-Ansatz.
15 Entsprechende Homologie-Kriterien sind bei der Beschreibung des dsRNAi-Verfahrens genannt und allgemein für PTGS-Verfahren oder dominant-negative Ansätze übertragbar. So kann man voraussichtlich unter Verwendung der BI-1-Nukleinsäuresequenzen auch die Expression von homologen BI-1-Proteinen in anderen Arten
20 effektiv supprimieren, ohne dass die Isolierung und Strukturaufklärung der dort vorkommenden BI-1-Homologen zwingend erforderlich wäre. Dies erleichtert erheblich den Arbeitsaufwand. Analog kann man voraussichtlich auch unter Verwendung von dominant-negativen Varianten eines BI-1-Proteins die
25 Funktion/Aktivität seines Homologs in anderen Pflanzenarten effektiv vermindern oder unterdrücken.

Alle Substanzen und Verbindungen die direkt oder indirekt eine
30 Verminderung der Proteinmenge, RNA-Menge, Genaktivität oder Proteinaktivität eines BI-1-Proteins bewirken, seien infolge unter der Bezeichnung "anti-BI-1"-Verbindungen zusammengefasst. Der Begriff "anti-BI-1"-Verbindung schließt explizit die in den oben beschriebenen Verfahren zum Einsatz kommenden Nuklein-säuresequenzen, Peptide, Proteine oder andere Faktoren ein.

35 "Einbringung" umfasst im Rahmen der Erfindung alle Verfahren, die dazu geeignet eine "anti-BI-1"-Verbindung, direkt oder indirekt, in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen, Kompartiment oder Gewebe derselben einzuführen oder dort zu generieren. Direkte und indirekte Verfahren sind
40 umfasst. Die Einbringung kann zu einer vorübergehenden (transienten) Präsenz einer "anti-BI-1"-Verbindung (beispielsweise einer dsRNA) führen oder aber auch zu einer dauerhaften (stabilen).

- Gemäß der unterschiedlichen Natur der oben beschriebenen Ansätze kann die "anti-BI-1"-Verbindung ihre Funktion direkt ausüben (zum Beispiel durch Insertion in ein endogenes BI-1 Gen). Die 5 Funktion kann aber auch indirekt nach Transkription in eine RNA (zum Beispiel bei antisense Ansätzen) oder nach Transkription und Translation in ein Protein (zum Beispiel bei Bindungs-faktoren) ausgeübt werden. Sowohl direkte als auch indirekt wirkende "anti-BI-1"-Verbindungen sind erfindungsgemäß umfasst.
- Einführen umfasst beispielsweise Verfahren wie Transfektion, 10 Transduktion oder Transformation.
- "Anti-BI-1" Verbindungen umfasst somit beispielsweise auch 15 rekombinante Expressionskonstrukte, die eine Expression (d.h. Transkription und ggf. Translation) beispielsweise einer BI-1-dsRNA oder einer BI-1 "antisense"-RNA Epidermis-spezifisch bedingen.
- In besagten Expressionskonstrukten steht ein Nukleinsäure-molekül, dessen Expression (Transkription und ggf. Translation) 20 eine "anti-BI-1"-Verbindung generiert, bevorzugt in funktioneller Verknüpfung mit mindestens einem genetischen Kontroll-element (beispielsweise einem Promotor), das eine Expression in einem Organismus, bevorzugt in Pflanzen, gewährleistet, vorzugsweise Epidermis-spezifisch. Soll das Expressionskonstrukt direkt 25 in die Pflanze eingeführt und die "anti-BI-1"-Verbindung (beispielsweise die BI-1 dsRNA) dort in plantae erzeugt werden, so sind pflanzenspezifische genetische Kontrollelemente (beispielsweise Promotoren) bevorzugt, wobei aus dem oben gesagten 30 die Epidermis-spezifische Aktivität des Promoters für eine Epidermis-spezifische Reduktion von BI-1 in den meisten Ausführungsformen wie oben beschrieben zwingend ist. Die "anti-BI-1"-Verbindung kann jedoch auch in anderen Organismen oder in 35 vitro erzeugt und dann in die Pflanze eingebracht werden. In diesem sind all prokaryotischen oder eukaryotischen genetischen Kontrollelemente (beispielsweise Promotoren) bevorzugt, die die Expression in den jeweils für die Herstellung gewählten Organismus erlauben.
- Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel 40 die sequentielle Anordnung eines Promotors mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz (zum Beispiel einer "anti-BI-1"-Verbindung) und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum

Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der transgenen Expression der Nukleinsäuresequenz, je nach Anordnung der Nukleinsäuresequenzen zu sense oder anti-sense RNA, erfüllen kann. Dazu ist nicht

- 5 unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben (*cis*- bzw. *trans*-Lokalisation). Bevorzugt
10 sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter der als Promoter fungierenden Sequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der transgen zu exprimierende Nuklein-
15 säuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.

- Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung als auch die
20 Herstellung einer Expressionskassette kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in Maniatis T, Fritsch EF und Sambrook J (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Silhavy TJ,
25 Berman ML und Enquist LW (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Ausubel FM et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience und bei Gelvin et al. (1990) In: Plant Molecular Biology Manual beschrieben
30 sind. Zwischen beide Sequenzen können aber auch weitere Sequenzen positioniert werden, die zum Beispiel die Funktion eines Linkers mit bestimmten Restriktionsenzymschnittstellen oder eines Signalpeptides haben. Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expression von Fusionsproteinen führen. Bevorzugt
35 kann die Expressionskassette, bestehend aus einer Verknüpfung von Promoter und zu exprimierender Nukleinsäuresequenz, integriert in einem Vektor vorliegen und durch zum Beispiel Transformation in ein pflanzliches Genom insertiert werden. Die Kontrollelemente vermitteln bevorzugt eine Epidermis-spezifische
40 Expression.

Die obengenannten Verfahren (a) bis (i) können auch für die Reduktion der Aktivität oder Funktion, insbesondere der Expression der anderen hier genannten Proteine eingesetzt

werden, insbesondere zur Reduktion von MLO, RacB und NaOx verwendet werden.

Das BI1-Protein aus Gerste (hvBI1) wird vorwiegend im Mesophyll exprimiert (Beispiel 6) und infolge einer Infektion mit Blumeria (syn. Erysiphe) graminis f. sp.hordei hochreguliert (Beispiel 2). Die rekombinante mesophyll-spezifische Überexpression in mlo-resistenter Gerste führt - neben der Resistenz gegen insbesondere nekrotrophe und hemibiotrophe Pathogene - zu einer Blumeria (syn. Erysiphe) graminis f. sp.hordei -resistenten Pflanze, die keine nekrotischen Flecken („mlo-Flecken“; negative Begleiterscheinung der mlo-Resistenz) zeigt. Unter Ausnutzen dieses Effekts lassen sich die negativen Begleiterscheinungen der mlo-vermittelten Resistenz (Ertragseinbuße von ca. 5%, Jörgensen JH (1992) Euphytica 63: 141-152); Hypersuszeptibilität gegen nekrotrophe Pilze, Jarosch B et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:508-514; Kumar J et al. (2001) Phytopathology 91:127-133) unterdrücken, ohne dass die mlo-Resistenz selber beeinträchtigt wird.

Ferner kann überraschenderweise gezeigt werden, dass eine Überexpression von BI1 eine Resistenz gegen Stressfaktoren wie nekrosen-auslösende Agenzien (isoliert z.B. aus nekrotrophen Schadpilzen; Beispiel 2) zur Folge hat.

Das erfindungsgemäße Verfahren bietet demnach eine effiziente biotechnologische Strategie der Resistenz gegen Nekrotisierung durch endogenen, abiotischen und biotischen Stress – beispielsweise mlo-Flecken, Ozonschäden, nekrotrophe und hemibiotrophe Schadorganismen.

BI1-Proteine scheinen zentrale Regulatoren der rasse-unspezifischen Pilzresistenz in Pflanzen zu sein. Dies ermöglicht eine breite Einsetzbarkeit in biotechnologischen Strategien zur Erhöhung der Pathogenresistenz in Pflanzen insbesondere der Pilzresistenz. Das erfindungsgemäße Verfahren kann im Prinzip auf alle Pflanzenarten angewendet werden. BI1-Proteine wurden in zahlreichen Pflanzen - Monokotyledonen und Dikotyledonen - identifiziert (s.o.).

„Ungefähr“ meint im Rahmen dieser Erfindung im Zusammenhang mit Zahlen- oder Größenangaben einen Zahlen- oder Größenbereich um den angegebenen Zahlen- oder Größenwert herum. Im allgemeinen

meint der Begriff ungefähr einen Bereich von jeweils 20% des angegebenen Wertes nach oben und nach unten.

- "Pflanze" im Rahmen der Erfindung meint alle Gattungen und Arten höherer und niedrigerer Pflanzen des Pflanzenreiches.
- Eingeschlossen unter dem Begriff sind die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprossen und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut, Pflanzenorgane, Gewebe, Protoplasten, Kallus und andere Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen, sowie alle anderen Arten von Gruppierungen von Pflanzenzellen zu funktionellen oder strukturellen Einheiten. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium.
- "Pflanze" umfaßt alle einjährige und mehrjährige, monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen und schließt beispielhaft jedoch nicht einschränkend solche der Gattungen Cucurbita, Rosa, Vitis, Juglans, Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium, Trigonella, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manihot, Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersicon, Nicotiana, Solarium, Petunia, Digitalis, Majorana, Ciahorium, Helianthus, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Heterocallis, Nemesis, Pelargonium, Panicum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Browalia, Glycine, Pisum, Phaseolus, Lolium, Oryza, Zea, Avena, Hordeum, Secale, Triticum, Sorghum, Picea und Populus ein.
- Der Begriff "Pflanze" umfaßt bevorzugt monokotyledone Kulturpflanzen, wie zum Beispiel Getreidearten wie Weizen, Gerste, Hirse, Roggen, Triticale, Mais, Reis, Sorghum oder Hafer sowie Zuckerrohr.
- Ferner umfaßt der Begriff dikotyledonen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel
- Brassicaceae wie Raps, Rübsen, Kresse, Arabidopsis, Kohlarten,
 - Leguminosae wie Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder Erdnuss

- Solanaceae wie Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine oder Paprika,
 - Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes, Salat oder Calendula,
 - Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini,
- sowie Lein (Flachs), Baumwolle, Hanf, Klee, Spinat, Roter Pfeffer, Möhre, Karotte, Rübe, Rettich, Zuckerrübe, Süßkartoffel, Gurke, Chicorée, Blumenkohl, Brokkoli, Spargel, Zwiebel, Knoblauch, Sellerie, Erdbeere, Himbeere, Brombeere, Ananas, Avocado, und den verschiedenen Baum-, Strauch-, Nuß- und Weinarten. Baumarten umfaßt bevorzugt Pflaume, Kirsche, Pfirsich, Nektarine, Aprikose, Banane, Papaya, Mango, Apfel, Birne, Quitte.

Im Rahmen der Erfindung sind solche Pflanzen bevorzugt, die als Nahrungs- oder Futtermittel zum Einsatz kommen, ganz besonders bevorzugt monokotyledone Gattungen und Arten mit landwirtschaftlicher Bedeutung wie Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen oder Zuckerrohr.

Der Begriff "Streßfaktor" umfaßt im Rahmen der vorliegenden Erfindung biotische Streßfaktoren (wie insbesondere die unten aufgeführten Pathogene) sowie abiotische Streßfaktoren. Beispielhaft jedoch nicht einschränkend sind als abiotische Streßfaktoren zu nennen: Chemischer Stress (z.B. durch Agrar- und/oder Umweltchemikalien), US-Bestrahlung, Hitze, Kälte, Wassermangel, erhöhte Feuchtigkeit.

"Streßresistenz" meint das Vermindern oder Abschwächen von Symptomen einer Pflanze infolge von Stress. Die Symptome können vielfältiger Art sein, umfassen aber bevorzugt solche die direkt oder indirekt zu einer Beeinträchtigung Qualität der Pflanze, der Quantität des Ertrages, der Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel führen oder aber auch Aussaat, Anbau, Ernte oder Prozessierung des Erntegutes erschweren.

"Pathogenresistenz" meint das Vermindern oder Abschwächen von Krankheitssymptomen einer Pflanze infolge eines Befalls durch mindestens ein Pathogen. Die Symptome können vielfältiger Art sein, umfassen aber bevorzugt solche die direkt oder indirekt zu einer Beeinträchtigung Qualität der Pflanze, der Quantität des

Ertrages, der Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel führen oder aber auch Aussaat, Anbau, Ernte oder Prozessierung des Erntegutes erschweren.

- 5 "Verleihen", "bestehen", "erzeugen" oder "erhöhen" einer Stress- oder Pathogenresistenz meint, dass die Abwehrmechanismen einer bestimmten Pflanzenart oder -sorte durch Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens im Vergleich zu dem Wildtyp der Pflanze ("Ausgangspflanze"), auf den das erfindungsgemäße
10 Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonsten gleichen Bedingungen (wie beispielsweise Klima- oder Anbaubedingungen, Stress- oder Pathogenart etc.) eine erhöhte Resistenz gegen ein und mehrere Stressfaktoren bzw. Pathogene aufweist. Dabei äußert sich die erhöhte Resistenz bevorzugt in einer verminderten
15 Ausprägung der Stress- oder Krankheitssymptome, wobei Krankheitssymptome - neben den oben erwähnten Beeinträchtigungen - auch beispielsweise die Penetrationseffizienz eines Pathogens in die Pflanze oder pflanzliche Zellen oder die Proliferationseffizienz in oder auf denselben umfaßt. Dabei sind
20 die Stress- oder Krankheitssymptome bevorzugt um mindestens 10 % oder mindestens 20 %, besonders bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens 90 % oder 95 % vermindert.
25 "Auswahl" meint in Bezug auf Pflanzen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangspflanze - die Resistenz gegen mindestens einen Stressfaktor oder Pathogen besteht oder erhöht ist, all die Verfahren, die eine zur Erkennung einer vorliegenden oder erhöhten Stress- bzw. Pathogenresistenz
30 geeignet sind. Dies können beispielsweise Symptome der Pathogeninfektion sein (z.B. Nekrosen-Ausbildung bei Pilzinfektion) aber auch die oben beschriebenen Symptome umfassen, die die Qualität der Pflanze, die Quantität des Ertrages, die Eignung zur Verwendung als Futter- oder
35 Nahrungsmittel usw. betreffen.

"Pathogen" meint im Rahmen der Erfindung beispielsweise jedoch nicht einschränkend Viren oder Viroide, Bakterien, Pilze, tierische Schädlinge, wie beispielsweise Insekten oder
40 Nematoden. Besonders bevorzugt sind Pilze, insbesondere nekrotrophe oder hemibiotrophe Pilze. Es ist jedoch anzunehmen, dass die mesophyll-spezifische Expression eines BI1-Proteins auch eine Resistenz gegen weitere Pathogene bewirkt, da insgesamt eine Resistenz gegen Stressfaktoren erzeugt wird.

Beispielsweise jedoch nicht einschränkend seien nachfolgende Pathogene zu nennen:

5 1. Pilzpathogene oder pilz-ähnliche Pathogene:

Pilzpathogene oder pilz-ähnliche Pathogene (wie z.B. Chromista) stammen vorzugsweise aus der Gruppe umfassend Plasmodiophoromycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten, 10 Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten (Fungi imperfecti). Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 1 bis 4 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen. Folgende englische und deutsche Termini können alternativ verwendet 15 werden:

Ährenfäule	-	ear rot / head blight
Stengelfäule	-	stalk rot
Wurzelfäule	-	root rot
20 Rost	-	rust
Falscher Mehltau		downy mildew

Weiter Übersetzungen können beispielsweise bei
<http://www.bba.de/english/database/psmengl/pilz.htm> gefunden
25 werden.

Tabelle 1: Erkrankungen hervorgerufen durch biotrophe, phytopathogene Pilze

Erkrankung	Pathogen
Braunrost	<i>Puccinia recondita</i>
Gelbrost	<i>P. striiformis</i>
Echter Mehltau	<i>Erysiphe graminis</i> / <i>Blumeria graminis</i>
Rost (gemeiner Mais)	<i>Puccinia sorghi</i>
Rost (südlicher Mais)	<i>Puccinia polyspora</i>
Tabak Blattflecken	<i>Cercospora nicotianae</i>
Rost (tropischer Mais)	<i>Physopella pallescens</i> , <i>P. zeae</i> = <i>Angiopsora zeae</i>

Tabelle 2: Erkrankungen hervorgerufen durch nekrotrophe und/oder hemibiotrophe Pilze und Oomyceten

Erkrankung	Pathogen
Spelzenbräune	<i>Septoria (Stagonospora) nodorum</i>
Blattdürre	<i>Septoria tritici</i>
Ährenfusarioesen	<i>Fusarium spp.</i>
Halmbruchkrankheit	<i>Pseudocercosporella herpotrichoides</i>
Flugbrand	<i>Ustilago spp.</i>
Kraut- und Knollenfäule	<i>Phytophthora infestans</i>
Weizensteinbrand	<i>Tilletia caries</i>
Schwarzbeinigkeit	<i>Gaeumannomyces graminis</i>
Anthracnose leaf blight	<i>Colletotrichum graminicola</i> (teleomorph: <i>Glomerella graminicola Politis</i>); <i>Glomerella tucumanensis</i> (anamorph: <i>Glomerella falcatum Went</i>)
Anthracnose stalk rot	
Aspergillus ear and kernel rot	<i>Aspergillus flavus</i>
Banded leaf and sheath spot ("Wurzeltöter")	<i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn = <i>Rhizoctonia microsclerotia</i> J. Matz (telomorph: <i>Thanatephorus cucumeris</i>)
Black bundle disease	<i>Acremonium strictum</i> W. Gams = <i>Cephalosporium acremonium</i> Auct. non Corda
Black kernel rot	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> = <i>Botryodiplodia theobromae</i>
Borde blanco	<i>Marasmiellus sp.</i>
Brown spot (black spot, stalk rot)	<i>Physoderma maydis</i>
Cephalosporium kernel rot	<i>Acremonium strictum</i> = <i>Cephalosporium acremonium</i>
Charcoal rot	<i>Macrophomina phaseolina</i>
Corticium ear rot	<i>Thanatephorus cucumeris</i> = <i>Corticium sasakii</i>
Curvularia leaf spot	<i>Curvularia clavata</i> , C. <i>eragrostidis</i> , = <i>C. maculans</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus eragrostidis</i>), <i>Curvularia inaequalis</i> , <i>C. intermedia</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus intermedius</i>), <i>Curvularia lunata</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus lunatus</i>), <i>Curvularia pallescens</i> (teleomorph:

Erkrankung	Pathogen
	<i>Cochliobolus pallescens</i>), <i>Curvularia senegalensis</i> , <i>C. tuberculata</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus tuberculatus</i>)
Didymella leaf spot	Didymella exitalis
Diplodia Ähren- und Stengelfäule	Diplodia frumenti (teleomorph: <i>Botryosphaeria festucae</i>)
Diplodia Ähren- und Stengelfäule, seed rot and seedling blight	Diplodia maydis = <i>Stenocarpella maydis</i>
Diplodia leaf spot or streak	<i>Stenocarpella macrospora</i> = <i>Diplodialeaf macrospora</i>
Brown stripe downy mildew	<i>Sclerophthora rayssiae</i> var. <i>zeae</i>
Crazy top downy mildew	<i>Sclerophthora macrospora</i> = <i>Sclerospora macrospora</i>
Green ear downy mildew (graminicola downy mildew)	<i>Sclerospora graminicola</i>
Dry ear rot (cob, kernel and stalk rot)	<i>Nigrospora oryzae</i> (teleomorph: <i>Khuskia oryzae</i>)
Ährenfäulen (minor)	<i>Alternaria alternata</i> = <i>A. tenuis</i> , <i>Aspergillus glaucus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Aspergillus</i> spp., <i>Botrytis cinerea</i> (teleomorph: <i>Botryotinia fuckeliana</i>), <i>Cunninghamella</i> sp., <i>Curvularia pallescens</i> , <i>Doratomyces stemonitis</i> = <i>Cephalotrichum stemonitis</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Gonatobotrys simplex</i> , <i>Pithomyces maydicus</i> , <i>Rhizopus microsporus</i> Tiegh., <i>R. stolonifer</i> = <i>R. nigricans</i> , <i>Scopulariopsis brumptii</i>
Ergot (horse's tooth)	<i>Claviceps gigantea</i> (anamorph: <i>Sphacelia</i> sp.)
Eyespot	<i>Aureobasidium zeae</i> = <i>Kabatiella zeae</i>
Fusarium Ähren- und Stengelfäule	<i>Fusarium subglutinans</i> = <i>F. moniliforme</i> var. <i>subglutinans</i>
Fusarium kernel, root and stalk rot, seed rot and seedling blight	<i>Fusarium moniliforme</i> (teleomorph: <i>Gibberella fujikuroi</i>)
Fusarium Stengelfäule, seedling root rot	<i>Fusarium avenaceum</i> (teleomorph: <i>Gibberella avenacea</i>)

Erkrankung	Pathogen
Gibberella Ähren- u. Stengelfäule	Gibberella zeae (anamorph: <i>Fusarium graminearum</i>)
Graue Ährenfäule	Botryosphaeria zae = <i>Physalospora zae</i> (anamorph: <i>Macrophoma zae</i>)
Gray leaf spot (Cercospora leaf spot)	<i>Cercospora sorghi</i> = <i>C. sorghi</i> var. <i>maydis</i> , <i>C. zeae-maydis</i>
Helmintosporium root rot	Exserohilum pedicellatum = <i>Helmintosporium pedicellatum</i> (teleomorph: <i>Setosphaeria pedicellata</i>)
Hormodendrum Ährenfäule (Cladosporium Fäule)	Cladosporium cladosporioides = <i>Hormodendrum cladosporioides</i> , <i>C. herbarum</i> (teleomorph: <i>Mycosphaerella tassiana</i>)
Leaf spots, minor	Alternaria alternata, <i>Ascochyta maydis</i> , <i>A. tritici</i> , <i>A. zeicola</i> , Bipolaris victoriae = <i>Helmintosporium victoriae</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus victoriae</i>), <i>C. sativus</i> (anamorph: <i>Bipolaris sorokiniana</i> = <i>H. sorokinianum</i> = <i>H. sativum</i>), <i>Epicoccum nigrum</i> , Exserohilum prolatum = <i>Drechslera prolatata</i> (teleomorph: <i>Setosphaeria prolatata</i>) <i>Graphium penicillioides</i> , <i>Leptosphaeria maydis</i> , <i>Leptothyrium zae</i> , <i>Ophiophaerella herpotricha</i> , (anamorph: <i>Scolecosporiella</i> sp.), <i>Paraphaeosphaeria michotii</i> , <i>Phoma</i> sp., <i>Septoria zae</i> , <i>S. zeicola</i> , <i>S. zeina</i>
Northern corn leaf blight (white blast, crown stalk rot, stripe)	Setosphaeria turcica (anamorph: Exserohilum turcicum = <i>Helmintosporium turcicum</i>)
Northern corn leaf spot Helmintosporium ear rot (race 1)	Cochliobolus carbonum (anamorph: <i>Bipolaris zeicola</i> = <i>Helmintosporium carbonum</i>)
Penicillium Ährenfäule (blue eye, blue mold)	Penicillium spp., <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. oxalicum</i>
Phaeocystostroma Stengel- und Wurzelfäule	Phaeocystostroma ambiguum, = <i>Phaeocytospora zae</i>
Phaeosphaeria leaf spot	Phaeosphaeria maydis = <i>Sphaerulina maydis</i>
Physalospora Ährenfäule (Botryosphaeria Ährenfäule)	Botryosphaeria festucae = <i>Physalospora zeicola</i> (anamorph: <i>Diplodia frumenti</i>)

Erkrankung	Pathogen
Purple leaf sheath	Hemiparasitic bacteria and fungi
Pyrenopeziza Stengel- und Wurzelfäule	Phoma terrestris = Pyrenopeziza terrestris
Pythium Wurzelfäule	Pythium spp., P. arrhenomanes, P. graminicola
Pythium Stengelfäule	Pythium aphanidermatum = P. butleri L.
Red kernel disease (ear mold, leaf and seed rot)	Epicoccum nigrum
Rhizoctonia Ährenfäule (sclerotial rot)	Rhizoctonia zeae (teleomorph: Waitea circinata)
Rhizoctonia Wurzel- und Stengelfäule	Rhizoctonia solani, Rhizoctonia zaeae
Wurzelfäulen (minor)	Alternaria alternata, Cercospora sorghi, Dictyochaeta fertilis, Fusarium acuminatum (teleomorph: Gibberella acuminata), F. equiseti (teleomorph: G. intricans), F. oxysporum, F. pallidoroseum, F. poae, F. roseum; G. cyanogena, (anamorph: F. sulphureum), Microdochium bolleyi, Mucor sp., Periconia circinata, Phytophthora cactorum, P. drechsleri, P. nicotianae var. parasitica, Rhizopus arrhizus
Rostratum leaf spot (Helminthosporium leaf disease, ear and stalk rot)	Setosphaeria rostrata, (anamorph: Exserohilum rostratum = He/minthosporium rostratum)
Falscher Java Mehltau	Peronosclerospora maydis = Sclerospora maydis
Falscher Philippinen Mehltau	Peronosclerospora philippinensis = Sclerospora philippinensis
Falscher Sorghum Mehltau	Peronosclerospora sorghi = Sclerospora sorghi
Spontaneum downy mildew	Peronosclerospora spontanea = Sclerospora spontanea
Falscher Zuckerrohr-Mehltau	Peronosclerospora sacchari = Sclerospora sacchari
Sclerotium Ährenfäule (southern blight)	Sclerotium rolfsii Sacc. (teleomorph: Athelia rolfsii)
Seed rot-seedling blight	Bipolaris sorokiniana, B. zeicola = Helminthosporium carbonum, Diplodia maydis, Exserohilum pedicillatum, Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum, Fusarium

Erkrankung	Pathogen
	avenaceum, F. culmorum, F. moniliforme, Gibberella zaeae (anamorph: F. graminearum), Macrohomina phaseolina, Penicillium spp., Phomopsis sp., Pythium spp., Rhizoctonia solani, R. zaeae, Sclerotium rolfsii, Spicaria sp.
Selenophoma leaf spot	Selenophoma sp.
Sheath rot	Gaeumannomyces graminis
Shuck rot	Myrothecium gramineum
Silage mold	Monascus purpureus, M. ruber
Flugbrand (Smut, common)	Ustilago zaeae = U. maydis
Smut, false	Ustilaginoidea virens
Kolbenbrand (Smut, head)	Sphacelotheca reiliana = Sporisorium holcisorghi
Southern corn leaf blight and stalk rot	Cochliobolus heterostrophus (anamorph: Bipolaris maydis = Helminthosporium maydis)
Southern leaf spot	Stenocarpella macrospora = Diplodia macrospora
Stengelfäulen (minor)	Cercospora sorghi, Fusarium episphaeria, F. merismoides, F. oxysporum Schlechtend, F. poae, F. roseum, F. solani (teleomorph: Nectria haematococca), F. tricinctum, Mariannaea elegans, Mucor sp., Rhopographus zaeae, Spicaria sp.
Lagerfäulen (Storage rots)	Aspergillus spp., Penicillium spp. und weitere Pilze
Tar spot	Phyllachora maydis
Trichoderma ear rot and root rot	Trichoderma viride = T. lignorum teleomorph: Hypocreia sp.
White ear rot, root and stalk rot	Stenocarpella maydis = Diplodia zaeae
Yellow leaf blight	Ascochyta ischaemi, Phyllosticta maydis (teleomorph: Mycosphaerella zaeae-maydis)
Zonate leaf spot	Gloeocercospora sorghi

Tabelle 4: Erkrankungen hervorgerufen durch Pilze und Oomyceten mit unklarer Einstufung hinsichtlich biotrophen, hemibiotrophen bzw. nekrotrophen Verhaltens

Erkrankung	Pathogen
Hyalothyridium leaf spot	Hyalothyridium maydis
Late wilt	Cephalosporium maydis

5

Besonders bevorzugt sind

- Plasmodiophoromycota wie *Plasmodiophora brassicae* (Kohlhernie), *Spongospora subterranea*, *Polymyxa graminis*,
- 10 - Oomycota wie *Bremia lactucae* (Falscher Mehltau an Salat), *Peronospora* (Falscher Mehltau) bei Löwenmaul (*P. antirrhini*), Zwiebel (*P. destructor*), Spinat (*P. effusa*), Sojabohne (*P. manchurica*), Tabak (Blauschimmel; *P. tabacina*) Alfalfa und Klee (*P. trifolium*), *Pseudoperonospora humuli* (Falscher Mehltau an Hopfen), *Plasmopara* (Falscher Mehltau bei Trauben) (*P. viticola*) und Sonnenblume (*P. halstedii*), *Sclerotophthora macrospora* (Falscher Mehltau bei Cerealien und Gäsern), *Pythium* (z.B. Wurzelbrand an Beta-Rübe durch *P. debaryanum*), *Phytophthora infestans* (Kraut- und Knollenfäule bei Kartoffel, Braunfäule bei Tomate etc.), *Albugo spec.*
- 20 - Ascomycota wie *Microdochium nivale* (Schneeschimmel an Roggen und Weizen), *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* (Ährenfäule v.a. bei Weizen), *Fusarium oxysporum* (*Fusarium-Welke* an Tomate), *Blumeria graminis* (Echter Mehltau an Gerste (f.sp. *hordei*) und Weizen (f.sp. *tritici*)), *Erysiphe pisi* (Erbsenmehltau), *Nectria galligena* (Obstbaumkrebs), *Unicnula necator* (Echter Mehltau der Weinrebe), *Pseudopeziza tracheiphila* (Roter Brenner der Weinrebe), *Claviceps purpurea* (Mutterkorn an z.B. Roggen und Gräsern), *Gaeumannomyces graminis* (Schwarzbeinigkeit an Weizen, Roggen u.a. Gräsern), *Magnaporthe grisea*, *Pyrenophora graminea* (Streifenkrankheit an Gerste), *Pyrenophora teres* (Netzfleckenkrankheit an Gerste), *Pyrenophora tritici-repentis* (Blattfleckenkrankheit (Blattdürre) an Weizen), *Venturia inaequalis* (Apfelschorf), *Sclerotinia sclerotiorum*

(Weißstengeligkeit, Rapskrebs), *Pseudopeziza medicaginis* (Klappenschorf an Luzerne, Weiß- und Rotklee).

- Basidiomyceten wie *Typhula incarnata* (Typhula-Fäule an Gerste, Roggen, Weizen), *Ustilago maydis* (Beulenbrand an Mais), *Ustilago nuda* (Flugbrand an Gerste), *Ustilago tritici* (Flugbrand an Weizen, Dinkel), *Ustilago avenae* (Flugbrand an Hafer), *Rhizoctonia solani* (Wurzeltöter an Kartoffeln), *Sphacelotheca* spp. (Kolbenbrand bei Sorghum), *Melampsora lini* (Rost bei Flachs), *Puccinia graminis* (Schwarzrost an Weizen, Gerste, Roggen, Hafer), *Puccinia recondita* (Braunrost an Weizen), *Puccinia dispersa* (Braunrost an Roggen), *Puccinia hordei* (Braunrost an Gerste), *Puccinia coronata* (Kronenrost an Hafer), *Puccinia striiformis* (Gelbrost an Weizen, Gerste, Roggen sowie zahlreichen Gräsern), *Uromyces appendiculatus* (Bohnenrost), *Sclerotium rolfsii* (Wurzel- und Stengelfäule bei zahlreichen Pflanzen).

- Deuteromyceten (*Fungi imperfecti*) wie *Septoria* (*Stagonospora*) *nodorum* (Spelzenbräune) an Weizen (*Septoria tritici*), *Pseudocercospora* *herpotrichoides* (Halmbruchkrankheit an Weizen, Gerste, Roggen), *Rynchosporium secalis* (Blattfleckenkrankheit an Roggen und Gerste), *Alternaria solani* (Dürrfleckenkrankheit an Kartoffel, Tomate), *Phoma betae* (Wurzelbrand an Beta-Rübe), *Cercospora beticola* (Cercospora-Blattfleckenkrankheit an Beta-Rübe), *Alternaria brassicae* (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblüttern), *Verticillium dahliae* (Rapswelke und -stengelfäule), *Colletotrichum lindemuthianum* (Brennfleckenkrankheit an Bohne), *Phoma lingam* - Umfallkrankheit (Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps), *Botrytis cinerea* (Grauschimmel an Weinrebe, Erdbeere, Tomate, Hopfen etc.).

- Am meisten bevorzugt sind *Phytophthora infestans* (Kraut- und Knollenfäule, Braunfäule bei Tomate etc.), *Microdochium nivale* (vormals *Fusarium nivale*; Schneeschimmel an Roggen und Weizen), *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum* und *Fusarium poae* (Ährenfäule an Weizen), *Fusarium oxysporum* (Fusarium-Welke an Tomate), *Magnaporthe grisea* (rice blast disease), *Sclerotinia sclerotiorum* (Weißstengeligkeit, Rapskrebs), *Septoria* (*Stagonospora*) *nodorum* und *Septoria tritici* (Spelzenbräune an Weizen), *Alternaria brassicae* (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblüttern), *Phoma lingam* (Umfallkrankheit,

Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps).

2. Bakterielle Pathogene:

5

Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 5 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

10

Tabelle 5: Bakterielle Erkrankungen

Erkrankung	Pathogen
Bacterial leaf blight and stalk rot	<i>Pseudomonas avenae</i> subsp. <i>avenae</i>
Bacterial leaf spot	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>holcicola</i>
Bakterielle Stengelfäule	<i>Enterobacter dissolvens</i> = <i>Erwinia dissolvens</i>
Schwarzbeinigkeit ("Bacterial stalk and top rot")	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> , <i>Erwinia chrysanthemi</i> pv. <i>zeae</i>
Bacterial stripe	<i>Pseudomonas andropogonis</i>
Chocolate spot	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i>
Goss's bacterial wilt and blight (leaf freckles and wilt)	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> = <i>Corynebacterium michiganense</i> pv. <i>andnebraskense</i>
Holcus spot	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
Purple leaf sheath	Hemiparasitic bacteria
Seed rot-seedling blight	<i>Bacillus subtilis</i>
Stewart's disease (bacterial wilt)	<i>Pantoea stewartii</i> = <i>Erwinia stewartii</i>
Corn stunt (achapparramiento, maize stunt, Mesa Central or Rio Grande maize stunt)	<i>Spiroplasma kunkelii</i>

15 Ganz besonders bevorzugt sind nachfolgende pathogene Bakterien: *Corynebacterium sepedonicum* (Bakterienringfäule an Kartoffel), *Erwinia carotovora* (Schwarzbeinigkeit an Kartoffel), *Erwinia amylovora* (Feuerbrand an Birne, Apfel, Quitte), *Streptomyces scabies* (Kartoffelschorf), *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Wildfeuer an Tabak), *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Fettfleckenkrankheit an Buschbohne), *Pseudomonas syringae* pv.

tomato ("bacterial speck" an Tomate), Xanthomonas campestris pv. malvacearum (Blattfleckenkrankheit an Baumwolle) und Xanthomonas campestris pv. oryzae (Bakterienfäule an Reis und anderen Gräsern).

5

3. Virale Pathogene:

"Virale Pathogene" schließt sämtliche Pflanzenviren ein wie beispielsweise Tabak- oder Cucumber-Mosaic Virus,

10 Ringspot-Virus, Nekrose-Virus, Mais Dwarf-Mosaic Virus etc.

Beispielhaft jedoch nicht einschränkend sind die in Tabelle 6 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

15

Tabelle 6: Virale Erkrankungen

Krankheit	Pathogen
American wheat stripe (wheat stripe mosaic)	American wheat stripe mosaic virus (AWSMV)
Barley stripe mosaic	Barley stripe mosaic virus (BSMV)
Barley yellow dwarf	Barley yellow dwarf virus (BYDV)
Brome mosaic	Brome mosaic virus (BMV)
Cereal chlorotic mottle	Cereal chlorotic mottle virus (CCMV)
Corn chlorotic vein banding (Brazilian maize mosaic)	Corn chlorotic vein banding virus (CCVBV)
Corn lethal necrosis	Viruskomplex aus Maize chlorotic mottle virus (MCMV) und Maize dwarf mosaic virus (MDMV) A oder B oder Wheat streak mosaic virus (WSMV)
Cucumber mosaic	Cucumber mosaic virus (CMV)
Cynodon chlorotic streak	Cynodon chlorotic streak virus (CCSV)
Johnsongrass mosaic	Johnsongrass mosaic virus (JGMV)
Maize bushy stunt	Mycoplasma-like organism (MLO) associated
Maize chlorotic dwarf	Maize chlorotic dwarf virus (MCDV)
Maize chlorotic mottle	Maize chlorotic mottle virus (MCMV)
Maize dwarf mosaic	Maize dwarf mosaic virus (MDMV) strains A, D, E and F
Maize leaf fleck	Maize leaf fleck virus (MLFV)
Maize line	Maize line virus (MLV)
Maize mosaic (corn leaf	Maize mosaic virus (MMV)

Krankheit	Pathogen
stripe, enanismo rayado)	
Maize mottle and chlorotic stunt	Maize mottle and chlorotic stunt virus
Maize pellucid ringspot	Maize pellucid ringspot virus (MPRV)
Maize raya gruesa	Maize raya gruesa virus (MRGV)
maize rayado fino (fine striping disease)	Maize rayado fino virus (MRFV)
Maize red leaf and red stripe	Mollicute
Maize red stripe	Maize red stripe virus (MRSV)
Maize ring mottle	Maize ring mottle virus (MRMV)
Maize rio IV	Maize rio cuarto virus (MRCV)
Maize rough dwarf (nanismo ruvido)	Maize rough dwarf virus (MRDV) (Cereal tillering disease virus)
Maize sterile stunt	Maize sterile stunt virus (strains of barley yellow striate virus)
Maize streak	Maize streak virus (MSV)
Maize stripe (maize chlorotic stripe, maize hoja blanca)	Maize stripe virus
Maize stunting	Maize stunting virus
Maize tassel abortion	Maize tassel abortion virus (MTAV)
Maize vein enation	Maize vein enation virus (MVEV)
Maize wallaby ear	Maize wallaby ear virus (MWEV)
Maize white leaf	Maize white leaf virus
Maize white line mosaic	Maize white line mosaic virus (MWLMV)
Millet red leaf	Millet red leaf virus (MRLV)
Northern cereal mosaic	Northern cereal mosaic virus (NCMV)
Oat pseudorosette (zakuklivanie)	Oat pseudorosette virus
Oat sterile dwarf	Oat sterile dwarf virus (OSDV)
Rice black-streaked dwarf	Rice black-streaked dwarf virus (RBSDV)
Rice stripe	Rice stripe virus (RSV)
Sorghum mosaic	Sorghum mosaic virus (SrMV) (auch: sugarcane mosaic virus (SCMV) Stämme H, I and M)
Sugarcane Fiji disease	Sugarcane Fiji disease virus (FDV)
Sugarcane mosaic	Sugarcane mosaic virus (SCMV) strains A, B, D, E, SC, BC, Sabi and MB (formerly MDMV-B)

Krankheit	Pathogen
Wheat spot mosaic	Wheat spot mosaic virus (WSMV)

4. Tierische Schädlinge

4.1 Insekten Pathogene:

5 Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien Insekten wie beispielsweise Käfer, Raupen, Läuse oder Milben zu nennen. Bevorzugt sind Insekten der Gattungen Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera,
10 Orthoptera, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Anoplura, Siphonaptera, Trichoptera, etc.. Besonders bevorzugt sind Coleoptera and Lepidoptera Insekten, wie beispielsweise den Maiszünsler (European Corn Borer), *Diabrotica barberi*, *Diabrotica undecimpunctata*, *Diabrotica virgifera*, *Agrotis 15 epsilon*, *Crymodes devastator*, *Feltia ducens*, *Agrotis gladiaria*, *Melanotus spp.*, *Aeolus mellillus*, *Aeolus mancus*, *Horistonotus uhleri*, *Sphenophorus maidis*, *Sphenophorus zae*, *Sphenophorus parvulus*, *Sphenophorus callosus*, *Phyllogphaga spp.*, *Anuraphis maidiradicis*, *Delia platura*, *Colaspis brunnea*, *Stenolophus 20 lecontei* und *Clivinia impressifrons*.

25 Ferner sind zu nennen: Das Getreidehähnchen (*Oulema melanopus*), die Fritfliege (*Oscinella frit*), Drahtwürmer (*Agrotis lineatus*) und Blattläuse (wie z.B. Haferblattlaus *Rhopalosiphum padi*, Grosse Getreideblattlaus *Sitobion avenae*).

4.2 Nematoden:

30 Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 7 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

Tabelle 7: Parasitäre Nematoden

Schädigung	Pathogene Nematode
Awl	<i>Dolichodorus spp.</i> , <i>D. heterocephalus</i>
Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen	<i>Ditylenchus dipsaci</i>
Burrowing	<i>Radopholus similis</i>
Haferzystenälchen	<i>Heterodera avenae</i> , <i>H. ziae</i> , <i>Punctodera chalcoensis</i>
Dagger	<i>Xiphinema spp.</i> , <i>X. americanum</i> , <i>X. mediterraneum</i>
False root-knot	<i>Nacobbus dorsalis</i>
Lance, Columbia	<i>Hoplolaimus columbus</i>
Lance	<i>Hoplolaimus spp.</i> , <i>H. galeatus</i>
Lesion	<i>Pratylenchus spp.</i> , <i>P. brachyurus</i> , <i>P. crenatus</i> , <i>P. hexincisus</i> , <i>P. neglectus</i> , <i>P. penetrans</i> , <i>P. scribneri</i> , <i>P. thornei</i> , <i>P. ziae</i>
Needle	<i>Longidorus spp.</i> , <i>L. breviannulatus</i>
Ring	<i>Criconemella spp.</i> , <i>C. ornata</i>
Wurzelgallenälchen	<i>Meloidogyne spp.</i> , <i>M. chitwoodi</i> , <i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i>
Spiral	<i>Helicotylenchus spp.</i>
Sting	<i>Belonolaimus spp.</i> , <i>B. longicaudatus</i>
Stubby-root	<i>Paratrichodorus spp.</i> , <i>P. christiei</i> , <i>P. minor</i> , <i>Quinisulcius acutus</i> , <i>Trichodorus spp.</i>
Stunt	<i>Tylenchorhynchus dubius</i>

- Ganz besonders bevorzugt sind *Globodera rostochiensis* und
 5 *G. pallida* (Zystenälchen an Kartoffel, Tomate u.a.
 Nachtschattengewächsen), *Heterodera schachtii* (Rübenzystenälchen
 an Zucker- und Futterrübe, Raps, Kohl etc.), *Heterodera avenae*
 (Haferzystenälchen an Hafer u.a. Getreidearten), *Ditylenchus*
 dipsaci (Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen an Roggen,
 10 Hafer, Mais, Klee, Tabak, Rübe), *Anguina tritici* (Weizenälchen,
 Radekrankheit an Weizen (Dinkel, Roggen), *Meloidogyne hapla*
 (Wurzelgallenälchen an Möhre, Gurke, Salat, Tomate, Kartoffel,
 Zuckerrübe, Luzerne)).
- 15 Als für die einzelnen Sorten bevorzugte Pilz- oder Virus-
 Pathogene sind beispielsweise zu nennen:

1. Gerste:

5 Pilz-, bakterielle und virale Pathogene: *Puccinia graminis* f.sp.
hordei, *Blumeria (Erysiphe) graminis* f.sp. hordei, barley yellow
dwarf virus (BYDV),

10 Pathogene Insekten / Nematoden: *Ostrinia nubilalis* (European
corn borer); *Agrotis ipsilon*; *Schizaphis graminum*; *Blissus
leucopterus leucopterus*; *Acrosternum hilare*; *Euschistus servus*;
15 *Deliaplatura*; *Mayetiola destructor*; *Petrobia latens*.

2. Sojabohne:

15 Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Phytophthora
megasperma* f.sp.*glycinea*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia
solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Diaporthe
phaseolorum* var. *sojae* (*Phomopsis sojae*), *Diaporthe phaseolorum*
var. *caulivora*, *Sclerotium rolfsii*, *Cercospora kikuchii*,
20 *Cercospora sojina*, *Peronospora manshurica*, *Colletotrichum
dematium* (*Colletotrichum truncatum*), *Corynespora cassicola*,
Septoria glycines, *Phyllosticta sojicola*, *Alternaria alternata*,
Pseudomonas syringae p.v. *glycinea*, *Xanthomonas campestris* p.v.
25 *phaseoli*, *Microsphaera diffussa*, *Fusarium semitectum*,
Phialophora gregata, *Sojabohnen Mosaikvirus*, *Glomerella
glycines*, *Tobacco Ring spot virus*, *Tobacco Streak virus*,
Phakopsorapachyrhizi, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*,
Pythium debaryanum, *Tomato spotted wilt virus*, *Heterodera
glycines* *Fusarium solani*.

30 Pathogene Insekten / Nematoden: *Pseudoplusia includens*;
Anticarsia gemmatalis; *Plathypena scabra*; *Ostrinia nubilalis*;
Agrotis ipsilon; *Spodoptera exigua*; *Heliothis virescens*;
35 *Helicoverpa zea*; *Epilachna varivestis*; *Myzus persicae*; *Empoasca
fabae*; *Acrosternum hilare*; *Melanoplus femur-rubrum*; *Melanoplus
differentialis*; *Hylemya platura*; *Sericothrips variabilis*; *Thrips
tabaci*; *Tetranychus turkestanii*; *Tetranychus urticae*;

3. Raps:

40 Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Albugo candida*,
Alternaria brassicaceae, *Leptosphaeria maculans*, *Rhizoctonia
solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycosphaerella brassiccola*,

*Pythium ultimum, Peronospora parasitica, Fusarium roseum,
Alternaria alternata.*

4. Alfalfa:

5

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Clavibacter michiganense* subsp. *insidiosum*, *Pythium ultimum*, *Pythium irregularare*, *Pythium splendens*, *Pythium debaryanum*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora megasperma*, *Peronospora trifoliorum*, *Phoma medicaginis* var. *medicaginis*, *Cercospora medicaginis*, *Pseudopeziza medicaginis*, *Leptotrichila medicaginis*, *Fusarium*, *Xanthomonas campestris* p.v. *alfalfae*, *Aphanomyces euteiches*, *Stemphylium herbarum*, *Stemphylium alfalfae*.

10

5. Weizen:

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Pseudomonas syringae* p.v. *atrofaciens*, *Urocystis agropyri*, *Xanthomonas campestris* p.v. *translucens*, *Pseudomonas syringae* p.v. *syringae*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Ustilago tritici*, *Ascochyta tritici*, *Cephalosporium gramineum*, *Collotetrichum graminicola*, *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*, *Puccinia striiformis*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Septoria (Stagonospora) nodorum*, *Septoria tritici*, *Septoria avenae*, *Pseudocercospora* *herpotrichoides*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia cerealis*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium ultimum*, *Bipolaris sorokiniana*, Barley Yellow Dwarf Virus, Brome Mosaic Virus, Soil Borne Wheat Mosaic Virus, Wheat Streak Mosaic Virus, Wheat Spindle Streak Virus, American Wheat Striate Virus, Claviceps purpurea, Tilletia tritici, Tilletia laevis, Ustilago tritici, Tilletia indica, Rhizoctonia solani, Pythium arrhenomanes, Pythium gramicola, Pythium aphanidermatum, High Plains Virus, European Wheat Striate Virus, Puccinia graminis f.sp. *tritici* (Wheat stem rust), Blumeria (Erysiphe) graminis f.sp. *tritici* (Wheat Powdery Mildew).

30

35

40

Pathogene Insekten / Nematoden: *Pseudaleletia unipunctata*; *Spodoptera frugiperda*; *Elasmopalpus lignosellus*; *Agrotis orthogonia*; *Elasmopalpus Zignosellus*; *Oulema melanopus*; *Hypera punctata*; *Diabrotica undecimpunctata howardi*; Russian wheat

aphid; *Schizaphis graminum*; *Macrosiphum avenae*; *Melanoplus femur-rubrum*; *Melanoplus differentialis*; *Melanoplus sanguinipes*; *Mayetiola destructor*; *Sitodiplosis mosellana*; *Meromyza americana*; *Hylemya coarctata*; *Frankliniella fusca*; *Cephus cinctus*; *Aceria tulipae*;

6. Sonnenblume:

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Plasmophora halstedii*,
10 *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aster Yellows*, *Septoria helianthi*,
Phomopsis helianthi, *Alternaria helianthi*, *Alternaria zinniae*,
Botrytis cinerea, *Phoma macdonaldii*, *Macrophomina phaseolina*,
Erysiphe cichoracearum, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus arrhizus*,
15 *Rhizopus stolonifer*, *Puccinia helianthi*, *Verticillium dahliae*,
Erwinia carotovorum p.v. Carotovora, *Cephalosporium acremonium*,
Phytophthora cryptogea, *Albugo tragopogonis*.

Pathogene Insekten / Nematoden: *Suleima helianthana*; *Homoeosoma electellum*; *Zygogramma exclamationis*; *Bothyrus gibbosus*;
20 *Neolasioptera murtfeldtiana*;

7. Mais:

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Fusarium moniliforme*
25 var. *subglutinans*, *Erwinia stewartii*, *Fusarium moniliforme*,
Gibberella zeae (*Fusarium graminearum*), *Stenocarpella maydis*
(*Diplodia maydis*), *Pythium irregularare*, *Pythium debaryanum*,
Pythium graminicola, *Pythium splendens*, *Pythium ultimum*, *Pythium aphanidermatum*, *Aspergillus flavus*, *Bipolaris maydis* O, T
30 (*Cochliobolus heterostrophus*), *Helminthosporium carbonum* I, II & III (*Cochliobolus carbonum*), *Exserohilum turcicum* I, II & III,
Helminthosporium pedicellatum, *Physoderma maydis*, *Phyllosticta maydis*, *Kabatiella maydis*, *Cercospora sorghi*, *Ustilago maydis*,
Puccinia sorghi, *Puccinia polysora*, *Macrophomina phaseolina*,
35 *Penicillium oxalicum*, *Nigrospora oryzae*, *Cladosporium herbarum*,
Curvularia lunata, *Curvularia inaequalis*, *Curvularia pallens*,
Clavibacter michiganense subsp. *nebrascense*, *Trichoderma viride*,
Maize Dwarf Mosaic Virus A & B, Wheat Streak Mosaic Virus, Maize
Chlorotic Dwarf Virus, *Claviceps sorghi*, *Pseudonomas avenae*,
40 *Erwinia chrysanthemi* p.v. *Zea*, *Erwinia corotovora*, Corn stunt
spiroplasma, *Diplodia macrospora*, *Sclerophthora macrospora*,
Peronosclerospora sorghi, *Peronosclerospora philippinesis*,
Peronosclerospora maydis, *Peronosclerospora sacchari*,
Spacelotheca reiliiana, *Physopella zaeae*, *Cephalosporium maydis*,

Caphalosporium acremonium, Maize Chlorotic Mottle Virus, High Plains Virus, Maize Mosaic Virus, Maize Rayado Fino Virus, Maize Streak Virus (MSV, Maisstrichel-Virus), Maize Stripe Virus, Maize Rough Dwarf Virus.

5

Pathogene Insekten / Nematoden: Ostrinia nubilalis; Agrotis ipsilon; Helicoverpa zea; Spodoptera frugiperda; Diatraea grandiosella; Elasmopalpus lignosellus; Diatraea saccharalis; Diabrotica virgifera; Diabrotica longicornis barberi; Diabrotica undecimpunctata howardi; Melanotus spp.; Cyclocephala borealis; Cyclocephala immaculata; Popillia japonica; Chaetocnema pulicaria; Sphenophorus maidis; Rhopalosiphum maidis; Anuraphis maidiradicis; Blissus leucopterus leucopterus; Melanoplus femur-rubrum; Melanoplus sanguinipes; Hylemyva platura; Agromyza parvicornis; Anaphothrips obscurus; Solenopsis milesta; Tetranychus urticae.

8. Sorghum:

20 Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: Exserohilum turcicum, Colletotrichum graminicola (Glomerella graminicola), Cercospora sorghi, Gloeocercospora sorghi, Ascochyta sorghina, Pseudomonas syringae p.v. syringae, Xanthomonas campestris p.v. holcicola, Pseudomonas andropogonis, Puccinia purpurea, Macrophomina phaseolina, Perconia circinata, Fusarium moniliforme, Alternaria alternate, Bipolaris sorghicola, Helminthosporium sorghicola, Curvularia lunata, Phoma insidiosa, Pseudomonas avenae (Pseudomonas alboprecipitans), Ramulispora sorghi, Ramulispora sorghicola, Phyllachara sacchari, Sporisorium reilianum (Sphaelotheca reiliana), Sphaelotheca cruenta, Sporisorium sorghi, Sugarcane mosaic H, Maize Dwarf Mosaic Virus A & B, Claviceps sorghi, Rhizoctonia solani, Acremonium strictum, Sclerotophthora macrospora, Peronosclerospora sorghi, Peronosclerospora philippinensis, Sclerospora graminicola, 35 Fusarium graminearum, Fusarium oxysporum, Pythium arrhenomanes, Pythium graminicola.

Pathogene Insekten / Nematoden: Chilo partellus; Spodoptera frugiperda; Helicoverpa zea; Elasmopalpus lignosellus; Feltia subterranea; Phyllophaga crinita; Eleodes, Conoderus und Aeolus spp.; Oulema melanopus; Chaetocnema pulicaria; Sphenophorus maidis; Rhopalosiphum maidis; Siphaflava; Blissus leucopterus leucopterus; Contarinia sorghicola; Tetranychus cinnabarinus; Tetranychus urticae.

9. Baumwolle:

Pathogene Insekten / Nematoden: *Heliothis virescens*; *Helicoverpa*

5 *zea*; *Spodoptera exigua*; *Pectinophora gossypiella*; *Anthonomus grandis*; *grandis*; *Aphis gossypii*; *Pseudatomoscelis seriatus*; *Trialeurodes abutilonea*; *Lygus lineolaris*; *Melanoplus femur-rubrum*; *Melanoplus differentialis*; *Thrips tabaci* (onion thrips); *Frankliniella fusca*; *Tetranychus cinnabarinus*;

10 *Tetranychus urticae*.

10. Reis:

Pathogene Insekten / Nematoden: *Diatraea saccharalis*; *Spodoptera*

15 *frugiperda*; *Helicoverpa zea*; *Colaspis brunnea*; *Lissorhoptrus oryzophilus*; *Sitophilus oryzae*; *Nephrotettix nigropictus*; *Blissus leucopterus leucopterus*; *Acrosternum hilare*.

11. Raps:

20

Pathogene Insekten / Nematoden: *Brevicoryne brassicae*; *Phylotreta cruciferae*; *Mamestra configurata*; *Plutella xylostella*; *Delia* ssp..

25

"BI1-Protein" meint im Rahmen der Erfindung Polypeptide die mindestens eine Sequenz die eine Homologie von mindestens 50%, bevorzugt mindestens 80%, besonders bevorzugt mindestens 90%, ganz besonders bevorzugt 100% aufweisen zu einem BI1-Konsensusmotiv ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

30

a) H(L/I)KXYY

b) AXGA(Y/F)XH

c) NIGG

d) P(V/P)(Y/F)E(E/Q)(R/Q)KR

35

e) (E/Q)G(A/S)S(V/I)GPL

f) DP(S/G)(L/I)(I/L)

g) V(G/A)T(A/S)(L/I)AF(A/G)CF(S/T)

h) YL(Y/F)LGG, bevorzugt EYLYLGG

i) L(L/V)SS(G/W)L(S/T)(I/M)L(L/M)W

40

j) DTGX(I/V)(I/V)E

Besonders bevorzugt ist dabei das BI- Konsensusmotiv f) YL(Y/F)LGG, ganz besonders bevorzugt (EYLYLGG). Dieses Motiv ist charakteristisch für pflanzliche BI1-Proteine.

Besonders bevorzugt kommen Sequenzen mit Homologie zu mindestens 2 oder 3 dieser Motive (a bis g) in einem BI1-Protein vor, ganz besonders bevorzugt mindestens 4 oder 5, am meisten bevorzugt 5 alle Motive a bis j. Weitere BI1 typischen Sequenzmotive kann der Fachmann unschwer aus dem Sequenzvergleich von BI1-Proteine - wie in Fig. 1 oder 6 dargestellt - ableiten.

10 Insbesondere bevorzugt sind BI-Proteine, die kodiert werden durch ein Polypeptid das mindestens eine Sequenz umfaßt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- a) den Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 und 38, und
- 15 b) Sequenzen, die eine Identität von mindestens 50%, bevorzugt mindstens 70%, besonders bevorzugt mindstens 90%, ganz besonders bevorzugt mindstens 95% zu einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 20 26, 28, 30, 32 und 38 aufweisen,
- c) Sequenzen die mindestens eine Teilsequenz von mindestens 10, bevorzugt 20, besonders bevorzugt 50 zusammenhängenden Aminosäureresten einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 25 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 und 38 umfassen.

Erfindungsgemäß von dem Begriff BI-Protein umfasst sind insbesondere natürliche oder künstliche Mutationen der BI1-Polypeptide gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 und 38 sowie homologe Polypeptide aus anderen Organismen, bevorzugt Pflanzen, welche weiterhin im wesentlichen gleiche Eigenschaften aufweisen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer 35 Aminosäurereste.

Umfaßt sind insofern auch Ausführungsformen unter Verwendung von BI1-Proteinen aus nicht-pflanzlichen Organismen wie beispielsweise Mensch (GenBank Acc.-No.: P55061), Ratte (GenBank Acc.-No.: P55062) oder Drosophila (GenBank Acc.-No.: Q9VSH3). 40 Zwischen pflanzlichen und nicht-pflanzlichen BI1-Proteinen konservierte Motive können durch Sequenzvergleiche leicht identifiziert werden (vgl. Alignment in Bolduc et al. (2003) Planta 216:377-386; Fig. 1 und 6).

Somit werden beispielsweise auch solche Polypeptide durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation eines Polypeptides gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 und 38 erhält.

5

Die zu den im Rahmen dieser Erfindung offenbarten BII-Sequenzen homologen Sequenzen aus anderen Pflanzen können z.B. durch

- a) Datenbanksuche in Banken von Organismen, deren genomische oder cDNA Sequenz ganz oder teilweise bekannt ist, unter Verwendung der bereitgestellten BII-Sequenzen als Suchsequenz oder
- b) Durchmustern von Gen- oder cDNA-Bibliotheken unter Verwendung der bereitgestellten BII-Sequenzen als Sonde -

aufgefunden werden. Die Durchmusterung von cDNA- oder genetischen Bibliotheken (beispielsweise unter Verwendung einer der unter SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 und 37 beschriebene Nukleinsäuresequenzen oder Teilen derselben als Sonde), ist ein dem Fachmann geläufiges Verfahren, um Homologe in anderen Arten zu identifizieren. Dabei haben die von den Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 und 37 abgeleiteten Sonden eine Länge von mindestens 20 bp, bevorzugt mindestens 50 bp, besonders bevorzugt mindestens 100 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 200 bp, am meisten bevorzugt mindestens 400 bp. Für die Durchmusterung der Bibliotheken kann auch ein zu den unter SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 und 37 beschriebenen Sequenzen komplementärer DNA-Strang eingesetzt werden.

40

Unter Homologie zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen wird die Identität der Nukleinsäuresequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA; Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389ff) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Gap Weight: 50

Length Weight: 3

Average Match: 10

Average Mismatch: 0

- Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 80 % auf Nukleinsäurebasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.

Unter Homologie zwischen zwei Polypeptiden wird die Identität der Aminosäuresequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

- | | | |
|----|----------------------|-------------------------|
| 15 | Gap Weight: 8 | Length Weight: 2 |
| | Average Match: 2,912 | Average Mismatch:-2,003 |
- Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 80 % auf Proteinbasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.
- 25 BI1-Proteine umfassen auch solche Polypeptide die durch Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, die unter Standardbedingungen mit einer der durch SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 , 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 und 37 beschriebenen BI1 Nukleinsäuresequenz, der zu ihr komplementären Nukleinsäuresequenz oder Teilen der vorgenannten hybridisieren und die gleichen wesentlichen Eigenschaften wie die unter SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 und 38 beschriebenen Proteine haben.
- 35 Der Begriff "Standardhybridisierungsbedingungen" ist breit zu verstehen und meint stringente als auch weniger stringente Hybridisierungsbedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind unter anderem bei Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T et al., in Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57) oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. beschrieben. Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrittes ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit

geringer Stringenz (mit ungefähr 2X SSC bei 50°C) und solchen mit hoher Stringenz (mit ungefähr 0.2X SSC bei 50°C bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3M Natriumcitrat, 3M NaCl, pH 7.0). Darüber hinaus kann die Temperatur während des Waschschriften von niedrig stringenten Bedingungen bei Raumtemperatur, ungefähr 22°C, bis zu stärker stringenten Bedingungen bei ungefähr 65°C angehoben werden. Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch 10 denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50% Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt.

15 "Wesentliche Eigenschaften" meint in Bezug auf ein BI-Protein beispielsweise eine oder mehr nachfolgender Eigenschaften:

- a) Verleihung oder Steigerung der Pathogenresistenz gegen 20 zumindest ein Pathogen bei Erhöhung Proteinmenge oder Funktion des besagten BI-Proteins in mindestens einem Gewebe der Pflanze, wobei besagtes Gewebe nicht die Blattepidermis ist.
- b) Ausbleiben eines spontan-induzierten Zelltodes bei Erhöhung 25 der Proteinmenge oder Funktion des besagten BI-Proteins
- c) Die Eigenschaft bei transienter co-Transfektion von Bax mit besagtem BI1-Protein beispielsweise in HEK293 Zellen die BAX-induzierte Apoptose signifikant zu inhibieren. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Bolduc N et al. 30 (2003) Planta 216:377-386).
- d) Das Vorliegen von fünf bis sieben putativen Transmembrandomänen innerhalb der besagten BI1-Proteins.
- e) Eine präferentielle Lokalisation in Zellmembranen, insbesondere der Kernhüll-, ER- und/oder Thylakoidmembran.

35 Dabei kann die quantitative Ausprägung besagter Eigenschaften 40 eines BI1-Proteins nach unten als auch nach oben im Vergleich zu einem Wert erhalten für das BI1-Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 oder 38 abweichen.

Der Begriff "Erhöhung der BI1 Proteinmenge oder Funktion" ist im Rahmen dieser Erfindung breit zu verstehen und kann auf unterschiedlichen zellbiologischen Mechanismen beruhen.

- 5 "Proteinmenge" meint die Menge eines BI1-Proteins in dem jeweils angegebenen Organismus, Gewebe, Zelle oder Zellkompartiment.

"Erhöhung der Proteinmenge" meint die mengenmäßige Erhöhung der Menge eines BI1-Proteins in dem jeweils angegebenen Organismus, Gewebe, Zelle oder Zellkompartiment. - beispielsweise durch 10 eines der unten beschriebenen Verfahren - im Vergleich zu dem Wildtyp derselben Gattung und Art auf den dieses Verfahren nicht angewendet wurde, aber unter ansonst gleichen Rahmenbedingungen (wie beispielsweise Kulturbedingungen, Alter der Pflanzen etc.). 15 Die Erhöhung beträgt dabei mindestens 10 %, bevorzugt mindestens 30 % oder mindestens 50 %, besonders bevorzugt mindestens 70 % oder 100 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 200 % oder 500 %, am meisten bevorzugt um mindestens 1000 %. Die Bestimmung 20 der Proteinmenge kann durch verschiedene dem Fachmann geläufige Verfahren erfolgen. Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien zu nennen: Das Mikro-Biuret Verfahren (Goa J (1953) Scand J Clin Lab Invest 5:218-222), die Folin-Ciocalteu-Methode (Lowry OH et al. (1951) J Biol Chem 193:265-275) oder die Messung der Adsorption von CBB G-250 (Bradford MM (1976) Analyt Biochem 25:248-254). Ferner kann eine Quantifizierung über immunologische Methoden wie beispielsweise Western-Blot erfolgen. Die Herstellung entsprechender BI1-Antikörper sowie die Durchführung von BI1-Western-Blots ist beschrieben (Bolduc et al. (2002) FEBS Lett 532:111-114). Eine indirekte 30 Quantifizierung kann über Northern-Blots realisiert werden, wobei die mRNA Menge in der Regel gut mit der resultierenden Proteinmenge korreliert. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (u.a. Bolduc et al. (2003) Planta 216:377-386; Matsumura H et al. (2003) Plant J 33:425-434).

35 "Funktion" meint bevorzugt die Eigenschaft eines BI1-Proteins den spontan-induzierten Zelltodes zu vermindern und/oder die Eigenschaft, die apoptose-indizierende Wirkung von Bax zu inhibieren. Entsprechende Funktionen zählen zu den wesentlichen 40 Eigenschaft eines BI1-Proteins.

"Erhöhung" der Funktion meint im Rahmen dieser Erfindung beispielsweise die mengenmäßige Steigerung der inhibitorischen Wirkung auf den Bax-induzierten apoptotischen Zelltod, welche

durch dem Fachmann geläufige Verfahren quantifiziert werden kann (s.o.) Der Erhöhung beträgt dabei mindestens 10 %, bevorzugt mindestens 30 % oder mindestens 50 %, besonders bevorzugt mindestens 70 % oder 100 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 200 % oder 500 %, am meisten bevorzugt um mindestens 1000 %. Verfahren zur Erhöhung der Funktion umfassen neben den oben beschriebenen Verfahren zur Erhöhung der Proteinmenge (die auch immer die Funktion erhöht) ferner beispielhaft - jedoch nicht einschränkend - insbesondere das Einführen von Mutationen 10 in ein BI1-Protein.

Die BI1-Proteinmenge kann beispielhaft jedoch nicht einschränkend durch eines der nachfolgenden Verfahren erhöht werden:

- 15 a) Rekombinante Expression oder Überexpression eines BI1-Proteins durch Einringen einer rekombinanten Expressionskassette umfassend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI1-Protein unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors, wobei besagter Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist.
- 20 b) Modifikation (z.B. Austausch) der regulatorischen Regionen (z.B. der Promotorregion) eines endogenen BI1-Gens beispielsweise Austausch gegen einen gewebespezifischen Promotor mittels homologer Rekombination, wobei besagter Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist.
- 25 c) Insertion einer Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI1-Protein in das pflanzliche Genom hinter einen gewebespezifischen Promotor mittels homologer Rekombination, wobei besagter Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist.
- 30 d) Erhöhung der Expression eines endogenen BI1-Proteins durch Einbringen eines Transkriptionsfaktors (z.B. eines artifiziellen Transkriptionsfaktors aus der Klasse der Zinkfingerproteine) geeignet zur Induktion der Expression besagten BI1-Proteins. Bevorzugt ist das Einringen einer rekombinanten Expressionskassette umfassend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für besagten Transkriptionsfaktor unter Kontrolle eines gewebespezifischen
- 35
- 40

Promotors, wobei besagter Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist.

- Der Begriff "Einbringen" umfaßt im Rahmen der Erfindung
5 allgemein alle Verfahren, die dazu geeignet die einzubringende Verbindung, direkt oder indirekt, in eine Pflanze oder eine Zelle, Kompartiment, Gewebe, Organ oder Samen derselben einzuführen oder dort zu generieren. Direkte und indirekte Verfahren sind umfaßt. Die Einbringen kann zu einer
10 vorübergehenden (transienten) Präsenz besagter Verbindung führen oder aber auch zu einer dauerhaften (stabilen) oder induzierbaren. Einführen umfaßt beispielsweise Verfahren wie Transfektion, Transduktion oder Transformation.
- 15 In den im Rahmen der Erfindung zum Einsatz kommenden rekombinanten Expressionskassetten steht ein Nukleinsäuremolekül (beispielsweise kodierend für ein BII-Protein) in funktioneller Verknüpfung mit mindestens einem gewebespezifischen Promotor, wobei besagter Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der
20 Blattepidermis aufweist und wobei der Promotor in Bezug auf die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz heterolog ist d.h. natürlicherweise nicht mit derselben kombiniert vorkommt. Die erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassetten können optional weitere genetische Kontrollelemente umfassen.
25 Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung des besagten Promotors mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes
30 der regulativen Elemente seine Funktion bei der rekombinanten Expression der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die rekombinante zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter der als Promoter fungierenden Sequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt
35 ist dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der rekombinante zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare. Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung als auch die
40

Herstellung einer rekombinanten Expressionskassette kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in Maniatis T, Fritsch EF und Sambrook J (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold

- 5 Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Silhavy TJ, Berman ML und Enquist LW (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Ausubel FM et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience und bei
10 Gelvin et al. (1990) In: Plant Molecular Biology Manual beschrieben sind. Zwischen beide Sequenzen können aber auch weitere Sequenzen positioniert werden, die zum Beispiel die Funktion eines Linkers mit bestimmten Restriktionsenzymschnittstellen oder eines Signalpeptides haben.
15 Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expression von Fusionsproteinen führen.

Bevorzugt kann die rekombinante Expressionskassette, bestehend aus einer Verknüpfung von Promoter und zu exprimierender

- 20 Nukleinsäuresequenz, integriert in einem Vektor vorliegen und durch zum Beispiel Transformation in ein pflanzliches Genom insertiert werden.

Unter einer rekombinanten Expressionskassette sind aber auch

- 25 solche Konstruktionen zu verstehen, bei denen der Promoter - zum Beispiel durch eine homologe Rekombination - vor ein endogenes BI1-Gen plaziert wird, und so die Expression des BI1-Proteins steuert. Analog kann auch die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz (z.B. kodierend für ein BI1-Protein) derart
30 hinter einen endogenen Promotor plaziert werden, dass der gleiche Effekt auftritt. Beide Ansätze führen zu rekombinanten Expressionskassetten im Sinne der Erfindung.

Unter einem "gewebespezifischen Promotor, der im wesentlichen
35 keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist" sind im Rahmen dieser Erfindung allgemein solche Promotoren zu verstehen, die geeignet sind eine rekombinante Expression einer Nukleinsäuresequenz mindestens in einem pflanzlichen Gewebe zu gewährleisten oder zu erhöhen, mit der Maßgabe, dass

- 40 a) besagtes pflanzliches Gewebe ausgewählt ist aus allen pflanzlichen Geweben mit Ausnahme der Blattepidermis, und

- 5 b) die rekombinante Expression unter Kontrolle des besagten Promotors in besagtem pflanzlichen Gewebe mindestens das fünffache, bevorzugt mindestens das zehnfache, besonders bevorzugt mindestens das einhundertfache der Expression in der pflanzlichen Blattepidermis beträgt.

Dem Fachmann sind zahlreiche Promotoren bekannt, die diesen Anforderungen genügen. Insbesondere geeignet sind gewebespezifische Promotoren, wie beispielsweise, jedoch nicht einschränkend Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, 10 Ovarien, Blüten, Stengel, Wurzeln, Knollen oder Samen.

- a) Als Samen spezifische Promotoren bevorzugt sind zum Beispiel die Promotoren des Phaseolins (US 5,504,200; Bustos MM et al. (1989) Plant Cell 1(9):839-53), 2S Albumins (Joseffson LG et al. (1987) J Biol Chem 262:12196-12201), Legumins (Shirsat A et al. (1989) Mol Gen Genet 215(2):326-331) und Legumin B4 (LeB4; Baumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225:121-128; Baumlein H et al. (1992) Plant J 2(2):233-9; Fiedler U et al. (1995) Biotechnology (NY) 13(10):1090f), USP (unknown seed protein; Baumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225(3):459-67), Napins (US 5,608,152; Stalberg K et al. (1996) L Planta 199:515-519), Saccharosebindeproteins (WO 00/26388), Oleosins (WO 98/45461), oder der Bce4-Promoter aus Brassica (WO 91/13980). Weitere geeignete samenspezifische Promotoren sind die der Gene kodierend für das "High Molecular Weight Glutenin" (HMWG), Gliadin, Verzweigungsenzym, ADP Glucose Pyrophosphatase (AGPase) oder die Stärkesynthase. Bevorzugt sind ferner Promotoren, die eine samenspezifische Expression in Monokotyledonen wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis etc. erlauben. Vorteilhaft eingesetzt werden können der Promoter des lpt2 oder lpt1-Gen (WO 95/15389, WO 95/23230) oder die Promotoren beschrieben in WO 99/16890 (Promotoren des Hordein-Gens, des Glutelin-Gens, des Oryzin-Gens, des Prolamin-Gens, des Gliadin-Gens, des Glutelin-Gens, des Zein-Gens, des Kasirin-Gens oder des Secalin-Gens). Weitere samenspezifische Promotoren sind beschrieben in WO 89/03887.
- 40 b) Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren umfassen beispielsweise den Promotor des Patatin Gens (GenBank Acc.-No.: A08215), den Patatin Promotor Klasse I B33-Promotor (GenBank Acc.-No.: X14483) oder den Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel. Insbesondere

bevorzugt ist der Promotor beschrieben durch SEQ ID NO: 29. Knollen-spezifische Promotoren sind im Rahmen der Erfindung insbesondere zum Erzielen einer Resistenz gegen *Phytophthora infestans* geeignet. Da obligat-biotrophe Pilze nur Blätter befallen, ist eine Aktivität im epidermalen Knollengewebe unerheblich.

- 5
- c) Blütenspezifische Promotoren umfassen beispielsweise den Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635) oder den Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593).
 - 10
 - d) Antheren-spezifische Promotoren umfassen beispielsweise den 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), den glob-1 Promotor und den γ -Zein Promotor.
 - 15
 - e) Ährenspezifische Promotoren, wie beispielsweise der in US 6,291,666. Ähren-spezifische Promotoren sind insbesondere zur Vermittlung einer Resistenz gegen Fusarium vorteilhaft.
 - 20
 - f) Mesophyll-spezifische Promotoren wie beispielsweise der Promotor des Weizen Germin 9f-3.8 Gens (GenBank Acc.-No.: M63224) oder der Gerste GerA Promotor (WO 02/057412). Besagte Promotoren sind insbesondere vorteilhaft, da sie sowohl mesophyll-spezifisch und pathogen-induzierbar sind. Ferner geeignet ist der mesophyll-spezifische Arabidopsis CAB-2 Promotor (GenBank Acc.-No.: X15222), sowie der Zea mays PPCZm1 Promotor (GenBank Acc.-No.: X63869). Insbesondere bevorzugt sind die Promotor beschrieben durch SEQ ID NO: 30, 31 oder 32.

30 Die in den erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassetten oder Vektoren enthaltenen Nukleinsäuresequenzen können mit weiteren genetischen Kontrollsequenzen neben einem Promoter funktionell verknüpft sein. Der Begriff der genetischen Kontrollsequenzen ist breit zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluß auf das Zustandekommen oder die Funktion der erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassette haben. Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, Promotorelemente oder Minimalpromotoren, die die expressionssteuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten

35

40

Stressfaktoren erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasserstress, Abscisinsäure (Lam E & Chua NH (1991) J Biol Chem 266(26):17131-17135) und Hitzestress (Schoffl F et al. (1989) Mol Gen Genet 217(2-3):246-53) beschrieben.

5

Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Regionen, Introns oder nichtkodierende 3'-Region von Genen wie beispielsweise das Actin-1 Intron, oder die Adh1-S Introns 1, 2 und 6 (allgemein: The Maize Handbook, Chapter 116, Freeling and Walbot, Eds., Springer, New York (1994)). Es ist gezeigt worden, dass diese eine signifikante Funktionen bei der Regulation der Genexpression spielen können. So wurde gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente Expression heterologer Gene verstärken können. Beispielhaft für Translationsverstärker sei die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus zu nennen (Gallie et al. (1987) Nucl Acids Res 15:8693-8711) und dergleichen. Sie können ferner die Gewebsspezifität fördern (Rouster J et al. (1998) Plant J 15:435-440).

20

Die rekombinante Expressionskassette kann vorteilhafterweise eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promoter enthalten, die eine erhöhte rekombinante Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen.

25

Auch am 3'-Ende der rekombinant zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die rekombinant zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Als Kontrollsequenzen geeignete Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator und der NOS (Nopaline-Synthase)-Terminator.

Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom erlauben. Bei der homologen Rekombination kann zum Beispiel der natürliche Promoter eines BI1-Gens gegen einen der bevorzugten gewebespezifischen Promoter ausgetauscht werden. Methoden wie die cre/lox-Technologie erlauben eine gewebespezifische, unter

Umständen induzierbare Entfernung der rekombinanten Expressionskassette aus dem Genom des Wirtsorganismus (Sauer B (1998) Methods. 14(4):381-92). Hier werden bestimmte flankierende Sequenzen dem Zielgen angefügt (lox-Sequenzen), die 5 später eine Entfernung mittels der cre-Rekombinase ermöglichen.

Eine rekombinante Expressionskassetten und die von ihr abgeleiteten Vektoren können weitere Funktionselemente enthalten. Der Begriff Funktionselement ist breit zu verstehen 10 und meint all solche Elemente, die einen Einfluß auf Herstellung, Vermehrung oder Funktion der erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassetten, Vektoren oder rekombinanten Organismen haben. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen:

- 15 a) Selektionsmarker, die eine Resistenz gegen einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456), Antibiotika oder Biozide, bevorzugt Herbizide, wie zum Beispiel Kanamycin, G 418, Bleomycin, 20 Hygromycin, oder Phosphinotricin etc. verleihen. Besonders bevorzugte Selektionsmarker sind solche die eine Resistenz gegen Herbizide verleihen. Beispielhaft seien genannt: DNA Sequenzen, die für Phosphinothricinacetyltransferasen (PAT) kodieren und Glutaminsynthaseinhibitoren inaktivieren (bar und pat Gen), 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthasegene (EPSP Synthasegene), die eine Resistenz gegen Glyphosat[®] (N-(phosphonomethyl)glycin) verleihen, das für das Glyphosat[®] degradierende Enzyme kodierende gox Gen (Glyphosatoxidoreduktase), das deh Gen (kodierend für eine Dehalogenase, die Dalapon[®] inaktiviert), Sulfonlurea- und Imidazolinon inaktivierende Acetolactatsynthasen sowie bxn Gene, die für Bromoxynil degradierende Nitrilaseenzyme kodieren, das aasa-Gen, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Apectinomycin verleiht, das 25 Streptomycinphosphotransferase (SPT) Gen, das eine Resistenz gegen Streptomycin gewährt, das Neomycinphosphotransferas (NPTII) Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin oder Geneticidin verleiht, das Hygromycinphosphotransferase (HPT) Gen, das eine Resistenz gegen Hygromycin vermittelt, das 30 Acetolactatsynthas Gen (ALS), das eine Resistenz gegen Sulfonylharnstoff-Herbizide verleiht (z.B. mutierte ALS-Varianten mit z.B. der S4 und/oder Hra Mutation).

- b) Reportergene, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren und über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressionsortes oder -zeitpunktes gewährleisten. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie das "green fluorescence protein" (GFP) (Sheen et al. (1995) Plant Journal 8(5):777-784; Haseloff et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(6):2122-2127; Reichel et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93(12):5888-5893; Tian et al. (1997) Plant Cell Rep 16:267-271; WO 97/41228; Chui WL et al. (1996) Curr Biol 6:325-330; Leffel SM et al. (1997) Biotechniques. 23(5):912-8), die Chloramphenicoltransferase, eine Luziferase (Ow et al. (1986) Science 234:856-859; Millar et al. (1992) Plant Mol Biol Rep 10:324-414), das Aequorin (Prasher et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun 126(3):1259-1268), die β -Galactosidase, R-Locus Gen (kodieren ein Protein, das die Produktion von Anthocyaninpigmenten (rote Färbung) in pflanzlichen Gewebe reguliert und so eine direkte Analyse der Promotoraktivität ohne Zugabe zusätzlicher Hilfstoffe oder chromogener Substrate ermöglicht; Dellaporta et al., In: Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts, 18th Stadler Genetics Symposium, 11:263-282, 1988), ganz besonders bevorzugt ist die β -Glucuronidase (Jefferson et al., EMBO J. 1987, 6, 3901-3907).
- c) Replikationsursprünge, die eine Vermehrung der erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassetten oder Vektoren in zum Beispiel E.coli gewährleisten. Beispielhaft seien genannt ORI (origin of DNA replication), der pBR322 ori oder der P15A ori (Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).
- d) Elemente, die für eine Agrobakterium vermittelte Pflanzentransformation erforderlich sind, wie zum Beispiel die rechte oder linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.
- Zur Selektion erfolgreich homolog rekombinierter oder auch transformierter Zellen ist es in der Regel erforderlich, einen selektionierbaren Marker zusätzlich einzuführen, der den erfolgreich rekombinierten Zellen eine Resistenz gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Herbizid), einen Metabolismusinhibitor

wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder ein Antibiotikum verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion der transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84).

5

Die Einführung einer erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassette in einen Organismus oder Zellen, Geweben, Organe, Teile bzw. Samen desselben (bevorzugt in Pflanzen bzw. pflanzliche Zellen, Gewebe, Organe, Teile oder Samen), kann 10 vorteilhaft unter Verwendung von Vektoren realisiert werden, in denen die rekombinanten Expressionskassetten enthalten sind. Die rekombinante Expressionskassette kann in den Vektor (zum Beispiel ein Plasmid) über eine geeignete Restriktionsschnittstelle eingeführt werden. Das entstandene 15 Plasmid wird zunächst in E.coli eingeführt. Korrekt transformierte E.coli werden selektioniert, gezüchtet und das rekombinante Plasmid mit dem Fachmann geläufigen Methoden gewonnen. Restriktionsanalyse und Sequenzierung können dazu dienen, den Klonierungsschritt zu überprüfen.

20

Vektoren können beispielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren oder auch Agrobakterien sein. In einer vorteilhaften Ausführungsform wird die Einführung der rekombinante Expressionskassette mittels Plasmidvektoren realisiert.

25

Bevorzugt sind solche Vektoren, die eine stabile Integration der rekombinanten Expressionskassette in das Wirtsgenom ermöglichen.

30

Die Herstellung eines transformierten Organismus (bzw. einer transformierten Zelle oder Gewebes) erfordert, dass die entsprechende DNA, RNA oder Protein in die entsprechende Wirtszelle eingebracht wird.

35

Für diesen Vorgang, der als Transformation (oder Transduktion bzw. Transfektion) bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (Keown et al. (1990) Methods Enzymol 185:527-537; Jenes B et al. (1993) Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von SD Kung und R Wu, Academic Press, S. 128-143 sowie in Potrykus (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 40 42:205-225).

So kann die DNA oder RNA beispielhaft direkt durch Mikroinjektion oder durch Bombardierung mit DNA-beschichteten Mikropartikeln eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch,

zum Beispiel mit Polyethylenglykol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die DNA kann auch durch Protoplastenfusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder Liposomen

5 erfolgen. Elektroporation ist eine weitere geeignete Methode zur Einführung von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert werden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (beispielsweise bei Bilang et al. (1991) Gene 100:247-250; Scheid et al. (1991) Mol Gen Genet 228:104-112; Guerche et al. (1987) Plant Science 52:111-116; Neuhause et al. (1987) Theor Appl Genet 75:30-36; Klein et al. (1987) Nature 327:70-73 ; Howell et al. (1980) Science 208:1265; Horsch et al. (1985) Science 227:1229-1231 ; DeBlock et al. (1989) Plant Physiol 91:694-701).

15 Bei Pflanzen werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind vor allem die
20 Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone, die sogenannte "particle bombardment" Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung und die Mikroinjektion.

25 Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Transformation auch durch bakterielle Infektion mittels Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes durchgeführt werden. Die Agrobacterium-vermittelte
30 Transformation ist am besten für dicotyledone Pflanzenzellen geeignet. Die Verfahren sind beispielsweise beschrieben bei Horsch RB et al. (1985) Science 225: 1229f).

Werden Agrobakterien verwendet, so ist die rekombinante
35 Expressionskassette in spezielle Plasmide zu integrieren, entweder in einen Zwischenvektor (englisch: shuttle or intermediate vector) oder einen binären Vektor. Wird ein Ti oder Ri Plasmid zur Transformation verwendet werden soll, ist zumindest die rechte Begrenzung, meistens jedoch die rechte und
40 die linke Begrenzung der Ti oder Ri Plasmid T-DNA als flankierende Region mit der einzuführenden rekombinanten Expressionskassette verbunden.

Bevorzugt werden binäre Vektoren verwendet. Binäre Vektoren können sowohl in E.coli als auch in Agrobacterium replizieren. Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen und einen Linker oder Polylinker flankiert von der rechten und linken T-DNA Begrenzungssequenz. Sie können direkt in Agrobacterium transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol Gen Genet 163:181-187). Das Selektionsmarkergen erlaubt eine Selektion transformierter Agrobakteria und ist zum Beispiel das nptII Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin verleiht. Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende Agrobacterium sollte bereits ein Plasmid mit der vir-Region enthalten. Diese ist für die Übertragung der T-DNA auf die pflanzliche Zelle erforderlich. Ein so transformiertes Agrobacterium kann zur Transformation pflanzlicher Zellen verwendet werden. Die Verwendung von T-DNA zur Transformation pflanzlicher Zellen ist intensiv untersucht und beschrieben (EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Albllasserdam, Chapter V; An et al. (1985) EMBO J 4:277-287). Verschiedene binäre Vektoren sind bekannt und teilweise kommerziell erhältlich wie zum Beispiel pBI101.2 oder pBIN19 (Bevan et al. (1984) Nucl Acids Res 12:8711f; Clontech Laboratories, Inc. USA). Weitere zur Expression in Pflanzen geeignet Promotoren sind beschrieben (Rogers et al. (1987) Methods Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11; Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

Direkte Transformationstechniken eignen sich im Prinzip für jeden Organismus und Zelltyp. Im Falle von Injektion oder Elektroporation von DNA bzw. RNA in pflanzliche Zellen sind keine besonderen Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache Plasmide wie die der pUC-Reihe können verwendet werden. Sollen vollständige Pflanzen aus den transformierten Zellen regeneriert werden, so ist es erforderlich, dass sich auf dem Plasmid ein zusätzliches selektionierbares Markergen befindet.

Stabil transformierte Zellen d.h. solche, die die eingeführte DNA integriert in die DNA der Wirtszelle enthalten, können von untransformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Als Marker kann beispielhaft jedes Gen fungieren, dass eine Resistenz gegen Antibiotika oder Herbizide (wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin etc.) zu verleihen vermag (s.o.). Transformierte Zellen, die ein solches

Marker gen exprimieren, sind in der Lage, in der Gegenwart von Konzentrationen eines entsprechenden Antibiotikums oder Herbizides zu überleben, die einen untransformierten Wildtyp abtöten. Beispiel für geeignete Selektionsmarker sind oben 5 genannt. Sobald eine transformierte Pflanzenzelle hergestellt wurde, kann eine vollständige Pflanze unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft von Kalluskulturen aus. Aus diesen noch undifferenzierten Zellmassen kann die Bildung von Sproß und 10 Wurzel in bekannter Weise induziert werden. Die erhaltenen Sprößlinge können ausgepflanzt und gezüchtet werden. Dem Fachmann sind Verfahren bekannt, um aus Pflanzenzellen, Pflanzenteile und ganze Pflanzen zu regenerieren. Beispielsweise werden hierzu Verfahren beschrieben von Fennell et al. (1992) 15 Plant Cell Rep. 11: 567-570; Stoeger et al (1995) Plant Cell Rep. 14:273-278; Jahne et al. (1994) Theor Appl Genet 89:525-533 verwendet. Die erhaltenen Pflanzen können in der üblichen Weise gezüchtet und/oder gekreuzt werden. Zwei oder mehr Generationen 20 sollten kultiviert werden, um sicherzustellen, dass die genomische Integration stabil und vererblich ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann vorteilhaft mit weiteren Verfahren die eine Pathogenresistenz (beispielsweise gegen Insekten, Pilze, Bakterien, Nematoden etc.), Streßresistenz oder 25 eine andere Verbesserung der pflanzlichen Eigenschaften bewirken kombiniert werden. Beispiele sind u.a. genannt bei Dunwell JM (2000) J Exp Bot. 51 Spec No:487-96.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft 30 Polypeptidsequenzen kodierend für B11 Protein umfassend mindestens eine Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
- a) den Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30, 32 oder 38,
 - b) Sequenzen die eine Homologie von mindestens 90%, bevorzugt mindestens 95%, besonders bevorzugt mindestens 98% zu einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30, 32 oder 38 aufweisen, und
 - c) Sequenzen die mindestens 10, bevorzugt mindestens 20, besonders bevorzugt mindestens 30 zusammenhängende Aminosäuren einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30, 32 oder 38 umfassen.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Nukleinsäuresequenzen kodierend für die erfindungsgemäßen neuen Polypeptidsequenzen kodierend für BI1-Proteine. Bevorzugt sind 5 die Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 oder 37, die dazu komplementäre Nukleinsäuresequenz und die durch Entartung (Degeneration) des genetischen Codes abgeleitete Sequenzen.
- 10 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft rekombinante Expressionskassetten, die eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen umfassen. In den erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassetten ist die Nukleinsäuresequenz kodierend für das BI1-Protein aus Gerste mit mindestens einem 15 genetischen Kontrollelement nach obiger Definition derart verknüpft, das die Expression (Transkription und ggf. Translation) in einem beliebigen Organismus - bevorzugt in Pflanzen - realisiert werden kann. Dazu geeignete genetische Kontrollelemente sind oben beschrieben. Die rekombinanten 20 Expressionskassetten können auch weitere Funktionselementen gemäß obiger Definition enthalten. Die insertierte Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI1-Protein aus Gerste kann in sense- oder antisense-Orientierung in die Expressionskassette insertiert sein, und damit zu Expression 25 von sense- oder antisense-RNA führen. Erfindungsgemäß sind auch rekombinante Vektoren, die die rekombinanten Expressionskassetten beinhalten.
- 30 "Rekombinant" meint bezüglich zum Beispiel einer Nukleinsäuresequenz, einer Expressionskassette oder einem Vektor enthaltend besagte Nukleinsäuresequenz oder einem Organismus transformiert mit besagter Nukleinsäuresequenz, Expressionskassette oder Vektor alle solche durch gentechnische Methoden zustandegekommene Konstruktionen, in denen sich 35 entweder
- a) die BI1 Nukleinsäuresequenz, oder
- b) eine mit der BI1 Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpfte 40 genetische Kontrollsequenz, zum Beispiel ein Promotor, oder
- c) (a) und (b)

sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft eine Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste sein kann. Natürliche genetische Umgebung meint den natürlichen chromosomalen Locus in dem Herkunftsorganismus oder das Vorliegen in einer genomischen Bibliothek. Im Fall einer genomischen Bibliothek ist die natürliche, genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch teilweise erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an einer Seite und hat eine Sequenzlänge von mindestens 50 bp, bevorzugt mindestens 500 bp, besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 5000 bp. Eine natürlich vorkommende Expressionskassette - beispielsweise die natürlich vorkommende Kombination des BII-Promotors mit dem entsprechenden BII-Gen - wird zu einer rekombinanten Expressionskassette, wenn diese durch nicht-natürliche, synthetische ("künstliche") Verfahren wie beispielsweise einer Mutagenisierung geändert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (US 5,565,350; WO 00/15815; siehe auch oben).

Ein anderer Gegenstand der Erfindung betrifft rekombinante Organismen, transformiert mit wenigstens einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, Expressionskassette oder einem erfindungsgemäßen Vektor, sowie Zellen, Zellkulturen, Gewebe, Teile - wie zum Beispiel bei pflanzlichen Organismen Blätter, Wurzeln usw. - oder Vermehrungsgut abgeleitet von solchen Organismen. Organismus ist breit zu verstehen und meint prokaryotische und eukaryotische Organismen, bevorzugt Bakterien, Hefen, Pilze, tierische und pflanzliche Organismen. Als rekombinante Organismen bevorzugte Wirts- oder Ausgangsorganismen sind vor allem Pflanzen gemäß der oben genannten Definition.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen, rekombinanten Organismen und der von ihnen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile - wie zum Beispiel bei rekombinanten pflanzlichen Organismen Wurzeln, Blätter etc. - , und rekombinantes Vermehrungsgut wie Saaten oder Früchte, zur Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

Weiterhin wird ein Nukleinsäuremolekül, das antisense zu der erfindungsgemäßen Nukleinsäure ist, ein monoklonaler, spezifisch an das erfindungsgemäße Polypeptide bindender Antikörper und ein Fungizid, das die erfindungsgemäße Nukleinsäure, den erfindungsgemäßen Vektor, insbesondere einen infektiösen, z.B. viralen erfindungsgemäßen Vektor, das erfindungsgemäße Polypeptide in einer zur Auftragung auf Pflanzen geeigneten Form enthält, z.B. ver kapselt oder in einem infektiösen, vorzugsweise zur Übertragung von Nukleinsäuren oder Expression von Genen in einer Zelle geeigneten Organismus, wie ein Agrobacterium oder ein Virus.

In einer Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung eines BI-1 codierenden Nukleinsäuremoleküls oder eines BI-1 Proteins zur Herstellung einer Pathogen-resistanten Pflanze, vorzugsweise zur Herstellung einer gegen Pilze resistanten Pflanze oder zur Herstellung eines dies bewirkenden Fungizids oder zur Bekämpfung oder Behandlung von mit Pathogenen befallenen oder durch Pathogene bedrohten Pflanzen.

20

Sequenzen

1. SEQ ID NO: 1 : Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BII Protein aus Gerste (*Hordeum vulgare*).

25

2. SEQ ID NO: 2 : Aminosäuresequenz kodierend für ein BII Protein aus Gerste (*Hordeum vulgare*).

30

3. SEQ ID NO: 3 : Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BII Protein aus *Arabidopsis thaliana*.

4. SEQ ID NO: 4 : Aminosäuresequenz kodierend für ein BII Protein aus *Arabidopsis thaliana*.

35

5. SEQ ID NO: 5 : Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BII Protein aus Tabak.

6. SEQ ID NO: 6 : Aminosäuresequenz kodierend für ein BII Protein aus Tabak.

40

7. SEQ ID NO: 7 : Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BII Protein aus Reis.

8. SEQ ID NO: 8: Aminosäuresequenz kodierend für ein BI1 Protein aus Reis.

9. SEQ ID NO: 9 : Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI1 Protein aus Raps.

10. SEQ ID NO: 10 : Aminosäuresequenz kodierend für ein BI1 Protein aus Raps.

10 11. SEQ ID NO: 11 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Soja.

12. SEQ ID NO: 12: Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Soja.

15 13. SEQ ID NO: 13 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Soja.

14. SEQ ID NO: 14: Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Soja.

20 15. SEQ ID NO: 15 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Weizen.

25 16. SEQ ID NO: 16 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Weizen.

17. SEQ ID NO: 17 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Mais.

30 18. SEQ ID NO: 18 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Mais.

19. SEQ ID NO: 19 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Weizen.

35 20. SEQ ID NO: 20 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Weizen.

40 21. SEQ ID NO: 21 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Mais.

22. SEQ ID NO: 22 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Mais.

23. SEQ ID NO: 23 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BII Protein aus Mais.

5 24. SEQ ID NO: 24 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BII Protein aus Mais.

25. SEQ ID NO: 25 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BII Protein aus Weizen.

10 26. SEQ ID NO: 26 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BII Protein aus Weizen.

27. SEQ ID NO: 27 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil 15 eines BII Protein aus Mais.

28. SEQ ID NO: 28 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BII Protein aus Mais.

20 29. SEQ ID NO: 29 : Nukleinsäuresequenz kodierend für den Patatin Promotor aus Kartoffel.

30. SEQ ID NO: 30 : Nukleinsäuresequenz kodierend für den Germin 9f-3.8 Promotor aus Weizen.

25 31. SEQ ID NO: 31 : Nukleinsäuresequenz kodierend für den Arabidopsis CAB-2 Promotor

30 32. SEQ ID NO: 32 : Nukleinsäuresequenz kodierend für den PPCZml Promotor aus Mais

33. SEQ ID NO: 33 : Nukleinsäuresequenz kodierend für rekombinanten Expressionsvektor pUbIBI-1

35 34. SEQ ID NO: 34 : Nukleinsäuresequenz kodierend für rekombinanten Expressionsvektor pLo114UbiBI-1

40 35. SEQ ID NO: 35 : Nukleinsäuresequenz kodierend für rekombinanten Expressionsvektor pOXoBI-1

36. SEQ ID NO: 36 : Nukleinsäuresequenz kodierend für rekombinanten Expressionsvektor pLo114OXoBI-1

37. SEQ ID NO: 37: Nukleinsäuresequenz kodierend für BI-1
Protein aus Weizen
- 5 38. SEQ ID NO: 38: Aminosäuresequenz kodierend für BI-1
Protein aus Weizen
39. SEQ ID NO: 39: Nukleinsäuresequenz für PEN1 (= ROR2) aus
Gerste
- 10 40. SEQ ID NO: 40: Aminosäuresequenz kodierend für PEN1
 (= ROR2) aus Gerste
41. SEQ ID NO: 41: Nukleinsäuresequenz für PEN1 (= ROR2) aus
Arabidopsis thaliana
- 15 42. SEQ ID NO: 42: Aminosäuresequenz kodierend für PEN1
 (= ROR2) aus Arabidopsis thaliana
- 20 43. SEQ ID NO: 43: Nukleinsäuresequenz kodierend für SNAP34
aus Gerste
44. SEQ ID NO: 44: Aminosäuresequenz kodierend für SNAP34 aus
Gerste

25

Abbildungen

1. Fig. 1a-d: Vergleich von Proteinsequenzen verschiedener BI-1 Proteine aus Pflanzen. AtBI-1: Arabidopsis; BnBI-1:
Brassica napus (Raps); GmBI2: Glycine max (Soja; Variante 1); GmBI3: Glycine max (Soja; Variante 2); HVBI-1: Hordeum
vulgare (Gerste); NtBI-1: Nicotiana tabacum (Tabak); OsBI-1: Oryza sativa (Reis); TaBI11: Triticum aestivum (Weizen,
Variante 1); TaBI18: Triticum aestivum (Weizen, Variante 2); TaBI5 neu: Triticum aestivum (Weizen, Variante 3); ZmBI14:
Zea mays (Mais; Variante 1); ZmBI16: Zea mays (Mais;
Variante 2); ZmBI33: Zea mays (Mais; Variante 3); ZmBI8: Zea
mays (Mais; Variante 4); Consensus: Aus dem Alignment
abgeleitete Konsensussequenz.
- 30 40 2. Fig. 2: Vektorkarte für Vektor pUbiBI-1 (Ubi: Ubiquitin-Promotor; BI-1 Nukleinsäuresequenz kodierend für Gerste BI1-Protein; ter: Transkriptionsterminator). Angegeben sind

ferner die Lokalisation der Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme.

3. Fig. 3: Vektorkarte für Vektor pLO114UbiBI-1 (Ubi: Ubiquitin-Promotor; BI-1 Nukleinsäuresequenz kodierend für Gerste BI1-Protein; ter: Transkriptionsterminator). Angegeben sind ferner die Lokalisation der Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme.
4. Fig. 4: Vektorkarte für Vektor pOxoBI-1 (Oxo: TaGermin 9f-2.8 Promotor; BI-1 Nukleinsäuresequenz kodierend für Gerste BI1-Protein; ter: Transkriptionsterminator). Angegeben sind ferner die Lokalisation der Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme.
5. Fig. 5: Vektorkarte für Vektor pLO114OxoBI-1 (Oxo: TaGermin 9f-2.8 Promotor; BI-1 Nukleinsäuresequenz kodierend für Gerste BI1-Protein; ter: Transkriptionsterminator). Angegeben sind ferner die Lokalisation der Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme.
6. Fig. 6: Vergleich der Proteinssequenzen von BI-1 Proteinen aus Gerste (*Hordeum vulgare*, GenBank Acc.-No.: CAC37797), Reis (*Oryza sativa*, GenBank Acc.-No.: Q9MBD8), *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.-No.: Q9LD45) und Mensch (*Homo sapiens*, GenBank Acc.-No.: AAB87479). Schwarzhinterlegte Aminosäuren sind identisch in allen Arten. Grau hinterlegte Aminosäuren sind nur in Pflanzen identisch. Balken zeigen die vorausgesagten sieben Transmembrandomänen in HvBI-1 an.
7. Fig. 7: BI-1 Expression in resistenten und suszeptiblen Gersten-Linien (cDNA Gelblot-Analyse): cDNAs wurde mittels RT-PCR ausgehend von Gesamt-RNA synthetisiert. Gesamt-RNA wurde aus suszeptibler Gersten-Linie Pallas, resisterter Gersten-Linie BCPM1a12 und resisterter Gersten-Linie BCPm1o5 zum Zeitpunkt 0 (d.h. unmittelbar vor Inokkulation), sowie jeweils 1, 4 und 7 Tage nach Inokkulation mit *Bgh* und parallel dazu aus nicht-infizierten Kontrollpflanzen (Ø) gewonnen. Die RT-PCR für BI-1 wurde unter Verwendung von 20 Zyklen ausgeführt (s.u.). Die eingesetzte RNA-Menge (0.5 µg) wurde zusätzlich durch rRNA-Färbung mit Ethidiumbromid in Gelen kontrolliert. Wiederholung der Experimente ergab vergleichbare Resultate.

8. Fig. 8: *BI-1* wird im Mesophyllgewebe exprimiert (cDNA Gelblot-Analyse). RT-PCR wurde ausgehend von RNA isoliert aus Pallas (P) und BCPM1a12 (P10) (24 h nach Inokulation mit *BghA6*) durchgeführt. Für die Extraktion der Gesamt-RNA wurden abaxiale epidermale Streifen (E, inkulierte Positionen der Blätter) vom Mesophyll und der adaxialen Epidermis (M) separiert. *Ubiquitin 1 (Ubi)* wurde als Marker einer gewebeunspezifischen Genexpression verwendet. RT-PCR wurde unter Verwendung von 30 Zyklen durchgeführt.
- 10 9. Fig. 9: *BI-1* Expression wird während chemischer Resistenzinduktion reprimiert.
- (A) Chemisch induzierte Resistenz in der Gersten-Linie Pallas gg. *Blumeria graminis* (DC) Speer f.sp. *hordei* (*Bgh*). Gersten Primärblätter wurden mit 2,6-Dichloroisonicotinsäure (DCINA) behandelt und zeigten weniger Mehltau-Pustulen als entsprechende unbehandelte Kontrollpflanzen.
- 20 (B) RNA und cDNA Blots. RNA (10 µg) wurde 0, 1, 2 und 3 Tage nach Bodenbehandlung (soil drench treatment; dpt) mit DCINA bzw. der Kontrolle (Trägersubstanz) und zusätzlich 1 und 4 Tage nach Inokulation (dpi, entspricht 4 bzw. 7 dpt) analysiert. RT-PCR (*Ubi*, *BI-1*) wurde unter Verwendung von 20 Zyklen realisiert. Wiederholung führte zu vergleichbaren Ergebnissen (siehe Beispiel 2).
- 25 Als Kontrolle wurde BCI-4 eingesetzt. BCI-4 ist ein DCINA-induziertes Gen (Besser et al. (2000) Mol Plant Pathol. 1(5): 277-286) und ein Mitglied der Barley Chemically (=BTH) Induced- Genfamilie.
- 30 10. Fig. 10: Überexpression von *BI-1* induziert Super-suszeptibilität.
- 35 (A) Durchschnittliche Penetrationseffizienz von *Bgh* in 6 unabhängigen Experimenten mit *Bgh* auf Gersten-Linie Ingrid. PE von *Bgh* war signifikant ($p<0.01$, Students t-Test) erhöht in Zellen, die mit *pBI-1* transformiert (bombardiert) wurden im Vergleich zu Zellen, die mit der Leervektor-Kontrolle (*pGY1*). bombardiert wurden.
- 40 (B) Die Penetrationseffizienz von *Bgh* auf Zellen die mit einem antisense-*BI-1* Konstrukt (*pasBI-1*) bombardiert wurden,

war nicht-signifikant ($p>0.05$) vermindert im Vergleich zu Zellen, die mit der Leervektor-Kontrolle ($pGY1$). bombardiert wurden.

5 Die Säulen geben jeweils den Mittelwert der einzelnen Experimente wieder. Die Balken stellen den Standardfehler dar.

10 11. Fig. 11: Überexpression von *BI-1* induziert Bruch der *mlo5*-vermittelten Penetrationsresistenz.
Penetrationseffizienz von *Bgh* wurde in 3 bis 4 unabhängigen Experimenten mit *Bgh* auf den Gersten Linien Ingrid-*mlo5* bzw. Pallas-*mlo5* bewertet. PE durch *Bgh* war signifikant ($p<0.05$) erhöht in Zellen, die mit *pBI-1* transformiert (bombardiert) wurden im Vergleich zu Zellen, die mit der Leervektor-Kontrolle ($pGY1$). bombardiert wurden. Die Säulen geben jeweils den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten wieder. Die Balken stellen den Standardfehler dar.

20 12. Fig. 12: *BI-1* Expression wird durch toxische Kulturfiltrate aus *Bipolaris sorokiniana* induziert.
Northern-Blots (10 µg Gesamt-RNA) mit RNA aus Ingrid (I) und BCIngrid-*mlo5* (I22). RNA wurde 0, 24, 48 und 72 h nach Injektion der toxischen Kulturfiltrate von *Bipolaris sorokiniana* (T) bzw. Wasser (W) isoliert. *BI-1* mRNAs wurde auf Nylonmembranen nach stringenten Waschen detektiert. *BI-1*: Detektion von BAX Inhibitor 1 mRNA; *Ubi*: Detektion von Ubiquitin 1; *Asprot*: Detection der Aspartatprotease mRNA; *hat*: Stunden nach Behandlung ("h after treatment")

30 13. Fig. 13: *BI-1* Überexpression bricht Nicht-Wirtsresistenz von Gerste (cv. Manchuria) gegen *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*. Penetrationsraten wurden in drei unabhängigen Experimenten untersucht.

Beispiele**Allgemeine Methoden:**

- 5 Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeföhrten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen,
- 10 Agarosegelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA werden wie bei Sambrook et al.
- 15 (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeföhrts. Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgt mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma MWG-Licor nach der Methode von Sanger (Sanger et al. 1977) Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467).

20

Beispiel 1: Pflanzen, Pathogene und Inokulation

- Die Gerstensorten Ingrid, Pallas und die rückgekreuzte Linie BCPM1a12, BCPm1o5 und BCIngrid-m1o5 (I22) wurde von Lisa Munk, 25 Department of Plant Pathology, Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Dänemark zur Verfügung gestellt. Ihre Herstellung ist beschrieben (Kölster P et al. (1986) Crop Sci 26: 903-907).
- 30 Das 12 bis 36 h im Dunkeln auf feuchtem Filterpapier vorgekeimte Saatgut wurde, wenn nicht anders beschrieben, zu je 5 Körnern an den Rand eines Vierkanttopfes (8x8cm) in Fruhstorfer Erde vom Typ P ausgelegt, mit Erde bedeckt und regelmäßig mit Leitungswasser gegossen. Alle Pflanzen wurden in Klimaschränken oder -kammern bei 18°C und 60 % relativer Luftfeuchte und einem 35 16-stündigen Licht / 8-stündigen Dunkelheitszyklus mit 3000 bzw. 5000 lux (50 bzw. 60 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ Photonenflussdichte) 5 bis 8 Tage lang kultiviert und im Keimlingsstadium in den Versuchen verwendet. Bei Experimenten, in denen Applikationen an 40 Primärblättern durchgeföhrts wurden, waren diese vollständig entwickelt.

Vor Durchführung der transienten Transfektionsexperimente wurden die Pflanzen in Klimaschränken oder -kammern bei tagsüber 24°C,

nachts 20°C, 50 bis 60 % relativer Luftfeuchte und einem 16-stündigen Licht / 8-stündigen Dunkelheitszyklus mit 30000 lux kultiviert.

- 5 Für die Inokulation von Gerstenpflanzen wurde echter Gerstenmehltau *Blumeria graminis* (DC) Speer f.sp. *hordei* Em. Marchal der Rasse A6 (Wiberg A (1974) *Hereditas* 77: 89-148) (BghA6) verwendet. Dieser wurde vom Institut für Biometrie, JLU Gießen bereitgestellt. Die Nachzucht des Inokulums erfolgte in 10 Klimakammern zu den gleichen Bedingungen, wie sie oben für die Pflanzen beschrieben sind, durch Übertragung der Konidien von befallenem Pflanzenmaterial auf regelmäßig angezogene, 7 Tage alte Gerstenpflanzen cv. Golden Promise bei einer Dichte von 100 Konidien/mm².
- 15 Die Inokulation erfolgte auf primäre Blätter von Gerstenpflanzen mit nachfolgenden Konidien-Dichten: 5 Konidien/ mm² bei chemischer Induktion von Resistenz und makroskopischer Auswertung des Induktionserfolges, 50 Konidien/ mm² bei 20 Genexpressionsstudien und 150 Konidien/ mm² bei Überprüfung der Genttransformation mit transformierten Blattsegmenten. Die Inokulation mit BghA6 erfolgte unter Verwendung von 25 7 Tagen alten Keimlingen durch Abschütteln der Konidien bereits befallener Pflanzen in einem Inokulationsturm(soweit nicht anders angegeben).

Beispiel 2: Modulation der *BII* Expression mit DCINA

- 2,6-Dichlorisonikotinsäure (DCINA, Syngenta AG, Basel, Schweiz; 30 als 25% (w/w) Fomulierung) wurde auf 4-Tage alte Gerstenschößlinge der Sorte Pallas mittels Bodenbewässerung ("soil drench") in einer Endkonzentration von 8 mg/l Bodenvolumen appliziert. Die verwendete Suspension wurde mit Leitungswasser angesetzt. Als Kontrolle diente eine 35 Bodenbewässerung mit dem Trägermaterial (benetzbares Puder "wettable powder"). Nach drei Tagen wurden die Pflanzen mit *Blumeria graminis* (DC) Speer f.sp. *hordei* Em. Marchal der Rasse A6 (5 Konidien/ mm²) infiziert. Pflanzen mit chemisch induzierter Resistenz (CIR) wiesen ca. 70% weniger 40 Mehltaukolonien auf als die entsprechenden Kontrollpflanzen, die nur mit der Trägersubstanz behandelt wurden (Fig. 9A).

Northern Blot und RT-PCT Blots wurden zur Bestimmung der *BII* Transkriptmengen durchgeführt und zeigten eine überraschende

Verminderung der *BI1* Expression 1 bis 3 Tage nach chemischer Behandlung (Fig. 9B).

Beispiel 3: RNA-Extraktion

5 Gesamt RNA wurde aus 8 bis 10 primären Blattsegmenten (Länge 5 cm) mittels "RNA Extraction Buffer" (AGS, Heidelberg, Germany) extrahiert. Dazu wurden die zentrale Primärblattsegment von 5 cm Länge geerntet und in flüssigem Stickstoff in Mörsern
10 homogenisiert. Das Homogenisat wurde bis zur RNA-Extraktion bei -70°C gelagert. Aus dem tiefgefrorenen Blattmaterial wurde mit Hilfe eines RNA-Extraktions-Kits (AGS, Heidelberg) Gesamt-RNA extrahiert. Dazu wurden 200 mg des tiefgefrorenen Blattmaterials in einem Mikrozentrifugenröhrlchen (2 mL) mit 1,7 mL RNA-
15 Extraktionspuffer (AGS) überschichtet und sofort gut durchmischt. Nach Zugabe von 200 µL Chloroform wurde erneut gut gemischt und bei Raumtemperatur 45 min auf einem Horizontalschüttler bei 200 U/min geschüttelt. Anschließend wurde zur Phasentrennung 15 min bei 20000 g und 4°C zentrifugiert, die obere wässrige Phase in ein neues
20 Mikrozentrifugenröhrlchen überführt und die untere verworfen. Die wässrige Phase wurde erneut mit 900 µL Chloroform gereinigt, indem 3 mal für 10 sec homogenisiert und erneut zentrifugiert (s.o.) und abgehoben wurde. Zur Fällung der RNA wurde dann
25 850 µL 2-Propanol hinzugegeben, homogenisiert und für 30 bis 60 min auf Eis gestellt. Im Anschluß daran wurde für 20 min zentrifugiert (s.o.), vorsichtig der Überstand dekantiert, 2 mL 70 %iges Ethanol (-20°C) hinzu pipettiert, durchmischt und erneut 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann wiederum
30 dekantert und das Pelet vorsichtig mit einer Pipette von Flüssigkeitsresten befreit, bevor es an einem Reinluftarbeitsplatz im Reinluftstrom getrocknet wurde. Danach wurde die RNA in 50 µL DEPC-Wasser auf Eis gelöst, durchmischt und 5 min zentrifugiert (s.o.). 40 µL des Überstandes wurden als
35 RNA-Lösung in ein neues Mikrozentrifugenröhrlchen überführt und bei -70°C gelagert.

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde die RNA-Lösung 1:99 (v/v) mit destilliertem Wasser verdünnt und die Extinktion (Photometer DU 7400, Beckman) bei 260 nm gemessen ($E_{260\text{ nm}} = 1$ bei 40 µg RNA/mL). Gemäß der errechneten RNA-Gehalte wurden die Konzentrationen der RNA-Lösungen anschließend mit DEPC-Wasser auf 1 µg/µL angeglichen und im Agarosegel überprüft.

Zur Überprüfung der RNA-Konzentrationen im horizontalen Agarosegel (1 % Agarose in 1 x MOPS-Puffer mit 0,2 µg/mL Ethidiumbromid) wurde 1 µL RNA-Lösung mit 1 µL 10 x MOPS, 1 µL 5 Farbmarker und 7 µL DEPC-Wasser versetzt, nach Ihrer Größe bei 120 V Spannung im Gel in 1 x MOPS-Laupuffer über 1,5 h aufgetrennt und unter UV-Licht fotografiert. Eventuelle Konzentrationsunterschiede der RNA-Extrakte wurden mit DEPC-Wasser ausgeglichen und die Anpassung erneut im Gel überprüft.

10

Beispiel 4: Klonierung der BI1 cDNA Sequenz aus Gerste

Der Vollängenklon von hvBI1 (GenBank Acc.-No.: AJ290421) umfaßt am 3'-Ende zwei Stopp-Codons und am 5'-Ende ein potentielles 15 Start-Codon. Der ORF überspannt 247 Aminosäuren und zeigt die höchste Sequenzhomologie zu einem BI1-Gen aus Reis, Mais, Brassica napus und Arabidopsis thaliana (jeweils 86% Identität auf Nukleotidebene) sowie einem humanen BI1-Homolog (53% Ähnlichkeit) (Fig. 1 und 6). Die Aminosäuresequenz von hvBI1 20 umfaßt sieben potentielle Transmembrandomänen mit einer Orientierung des C-Terminus im Cytosol.

Nachfolgende Konstrukte wurden hergestellt:

25 a) Amplifikation eines 478 bp Fragment der Gerste BI1 cDNA (GenBank Acc.-No.: AJ290421)

BI1-sense 5'-atggacgccttactcgacacctcg-3'
BI1-antisense 5'- gccagagcaggatcgacgcc-3'

30

b) Amplifikation eines 513 bp Ubi cDNA Fragment (GenBank Acc.- No.: M60175)

UBI-sense 5'-ccaagatgcagatcttcgtga-3'
UBI-antisense 5'-ttcgcgtataggtaaaagagca-3'

35

c) Amplifikation eines 871 bp Vollängen BI1 Leserahmens

40 BI1VL sense 5'-ggattcaacgcgcgcaggacaagc-3'
BI1VL antisense 5'-gtcgacgcggtagcgatctacatg-3'

Die erhaltenen Fragmente wurden in den Vektor pGEM-T mittels T-Überhang-Ligation ligiert und dienten als Ausgangsplasmide für die Herstellung von Sonden (z.B. für Northern-Blot) bzw. dsRNA.

Die einzelnen Konstrukte trugen die Bezeichnung pGEMT-BI1 ,
pGEMT-BI1VL(240) und pGEMT-UBI.

Das BI1-Volllängenprodukt wurde aus pGEMT in die SalI
5 Schnittstelle des pGY-1 vektors (Schweizer, P., Pokorny, J.,
Abderhalden, O. & Dudler, R. (1999) Mol. Plant-Microbe Interact.
12, 647-654) unter Verwendung der SalI-Schnittstelle in pGEMT
und mittels der dem BI1VL antisense Primer angefügten SalI-
Schnitstellen umkloniert. Vektoren mit sense (pBI-1) und
10 antisense Orientierung (pasBI-1) wurden isoliert und
resequenziert. Die Vektoren enthalten die BI-1 Sequenz unter
Kontrolle des CaMV 35S Promotors.

Beispiel 5: Reverse Transkription - Polymerasekettenreaktion
15 (RT-PCR)

Zum Nachweis von niedrigen Transkriptmengen wurde eine semi-
quantitative RT-PCR unter Verwendung des "OneStep RT-PCR Kit"
(Qiagen, Hilden, Germany) durchgeführt. Dabei wurde RNA
20 (Isolation s.o.) zuerst in cDNA übersetzt (Reverse
Transkription) und in einer anschließenden PCR-Reaktion mit
spezifischen Primern die gesuchte cDNA amplifiziert. Um die
Ausgangsmenge an Matrizen RNA abzuschätzen, wurde die
Amplifikation während der exponentiellen Phase (nach 20 Zyklen)
25 unterbrochen um Unterschiede in der Ziel-RNA wiederzuspiegeln.
Die PCR Produkte wurden über ein Agarosegel aufgetrennt,
denaturiert, auf Nylonmembranen geblottet und mit spezifischen,
nicht-radioaktiv-markierten Sonden unter stringenten
Standardbedingungen detektiert. Hybridisierung, Waschschritte
30 und Immunodetektion erfolgten wie unter "Northern Blot"
beschrieben. Für die einzelnen Reaktionen (25 µL-Ansatz) wurden
unter Verwendung des "One Step RT-PCR Kit" (Qiagen, Hilden,
Deutschland) zusammengegeben:

35 1000 ng Gesamt-RNA einer bestimmten Probe
0,4 mM dNTPs,
jeweils 0,6 µM sense- und antisense-Primer
0,10 µl RNase-Inhibitor
1 µL Enzymmix in 1x RT-Puffer

40 Die cDNA-Synthese (reverse Transkription) erfolgte für 30 min
bei 50°C. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase für 15
min bei 95°C inaktiviert, was zugleich Aktivierung der DNA-
Polymerase und Denaturierung der cDNA bewirkt. Anschließend

folgt eine PCR gemäß nachfolgendem Programm: 1 min mit 94 °C; 25 Zyklen mit 1 min mit 94 °C; 1 min mit 54°C und 1 min mit 72°C; abschließend 10 min mit 72°C. Dann Lagerung bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung. Die PCR-Produkte wurden im 1xTBE-Agarosegel 5 mit Ethidiumbromid aufgetrennt. Für die einzelnen Ansätze wurden mit den oben angegebenen Primer-Paaren amplifiziert.

Beispiel 6: Northern-Blot Analyse

- 10 Zur Vorbereitung des Northern-Blottings wurde die RNA im Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Ein Teil RNA-Lösung (entsprechend 10 µg RNA) wurde dazu mit gleichem Volumen Probenpuffer (mit Ethidiumbromid) gemischt, 5 min bei 94°C denaturiert, 5 min auf Eis gestellt, kurz zentrifugiert und 15 aufs Gel aufgetragen. Das 1 x MOPS-Gel (1,5 % Agarose, ultra pure) enthielt 5 Volumenprozent konzentrierte Formaldehydlösung (36,5 % [v/v]). Die RNA wurde bei 100 V 2 h lang aufgetrennt und anschließend geblottet.
- 20 Das Northern-Blotting erfolgte als aufwärtsgerichteter RNA-Transfer im Kapillarstrom. Das Gel wurde dazu zunächst 30 min in 25 mM Natriumhydrogen/dihydrogenphosphat-Puffer (pH 6,5) geschwenkt und zurechtgeschnitten. Ein Whatmanpapier wurde so vorbereitet, dass es auf einer horizontalen Platte auflag und 25 auf 2 Seiten in eine Wanne mit 25 mM Natriumhydrogen/dihydrogenphosphat-Puffer (pH 6,5) ragte. Auf dieses Papier wurde das Gel aufgelegt, wobei nicht bedeckte Teile des Whatmanpapiers mit einer Plastikfolie abgedeckt wurden. Das Gel wurde dann mit einer positiv geladenen 30 Nylonmembran (Boehringer-Mannheim) luftblasenfrei abgedeckt, wonach die Membran wiederum mit saugfähigem Papier in mehreren Lagen etwa 5 cm hoch bedeckt wurde. Das saugfähige Papier wurde noch mit einer Glasplatte und einem 100 g Gewicht beschwert. Das Blotting erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Die Membran 35 wurde kurz in A. bidest. geschwenkt und zur RNA-Fixierung mit einer Lichtenergie von 125 mJ im Crosslinker (Biorad) UV-Licht bestrahlt. Die Überprüfung des gleichmäßigen RNA-Transfers auf die Membran erfolgte auf der UV-Lichtbank.
- 40 Zur Detektion von Gersten mRNA wurden 10 µg Gesamt-RNA aus jeder Probe über ein Agarosegel aufgetrennt und mittels Kapillartransfer auf eine positiv-geladene Nylonmembran geblottet. Die Detektion erfolgte mit dem DIG-Systeme nach Herstellerangaben unter Verwendung von Digoxxygenin-markierten

antisense-RNA Sonden (wie beschrieben in Hückelhoven R et al. (2001) Plant Mol Biol 47:739-748).

Herstellung der Sonden: Zur Hybridisierung mit den zu
5 detektierenden mRNAs wurden mit Digoxygenin oder Fluoreszein
markierte RNA Sonden hergestellt. Diese wurden durch *in vitro*
Transkription eines PCR-Produktes mittels einer T7 oder SP6 RNA
Polymerase mit markierten UTPs erstellt. Als Vorlage für die PCR
gestützte Amplifikation dienten die oben beschriebenen
10 Plasmidvektoren pGEMT-BI1 , pGEMT-UBI. Je nach Orientierung des
Inserts wurden unterschiedliche RNA-Polymerasen zur Herstellung
des antisense-Stranges herangezogen. Die T7-RNA-Polymerase wurde
für für pGEMT-BI1 verwendet, die SP6-RNA-Polymerase für pGEMT-
UBI. Das Insert der einzelnen Vektor wurde über PCR mit
15 flankierenden Standard-Primern (M13 fwd und rev) amplifiziert.
Die Reaktion lief dabei mit folgenden Endkonzentrationen in
einem Gesamtvolumen von 50 µL PCR-Puffer (Silverstar) ab:

M13-fwd: 5'-GTAAAACGACGCCAGTG-3'
20 M13-Rev: 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'

10 % Dimethylsulfoxid (v/v)
je 2 ng/µL Primer (M13 forward und reversed)
1,5 mM MgCl₂,
25 0,2 mM dNTPs,
4 Units Taq-Polymerase (Silverstar),
2 ng/µL Plasmid-DNA.

Die Amplifikation verlief in einem Thermocycler (Perkin-Elmar
30 2400) temperaturgesteuert mit nachfolgendem Temperaturprogramm:
94°C für 3 min; 30 Zyklen mit 94°C für 30 sek, 58°C für 30 sek
und 72°C für 1,2 min; 72°C für 5 min; anschließend Kühlung bei
4°C bis zur Weiterverarbeitung. Der Erfolg der Reaktion wurde im
1%igen Agarosegel überprüft. Die Produkte wurden anschließend
35 mit einem "High Pure PCR-Product Purification Kit" (Boehringer-
Mannheim) aufgereinigt. Man erhielt etwa 40 µL Säuleneluat, das
erneut im Gel überprüft und bei -20°C gelagert wurde.

Die RNA Polymerisation, die Hybridisierung und die Immuno-
40 detektion wurden weitestgehend nach Angaben des Herstellers
des Kits zur nicht-radioaktiven RNA-Detektion durchgeführt (DIG
System User's Guide, DIG-Luminescence detection Kit, Boehringer-
Mannheim, Kogel et al. (1994) Plant Physiol 106:1264-1277). 4 µL
gereinigtes PCR-Produkt wurden mit 2 µL Transskriptionspuffer,

2 µl NTP-Markierungsmix, 2 µl-NTP-Mix und 10 µl DEPC-Wasser versetzt. Anschließend wurden 2 µL der T7-RNA-Polymeraselösung zu pipettiert. Die Reaktion wurde dann 2 h bei 37°C durchgeführt und anschließend mit DEPC-Wasser auf 100 µL aufgefüllt. Die RNA-Sonde wurde im Ethidiumbromidgel detektiert und bei -20°C gelagert.

Zur Vorbereitung der Hybridisierung wurden die Membranen zunächst 1 h bei 68°C in 2 x SSC (*Salt, Sodiumcitrate*), 0,1 % SDS-Puffer (*Natriumdodecylsulfat*) geschwenkt, wobei der Puffer 2 bis 3 mal erneuert wurde. Die Membranen wurden anschließend an die Innenwand auf 68°C vorgeheizter Hybridisierungsröhren angelegt und 30 min mit 10 mL *Dig-Easy-Hybridisierungspuffer* im vorgeheizten Hybridisierungsofen inkubiert. Währenddessen wurden 10 µL Sondenlösung in 80 µL Hybridisierungspuffer bei 94°C für 5 min denaturiert, anschließend auf Eis gestellt und kurz zentrifugiert. Zur Hybridisierung wurde die Sonde dann in 10 mL 68°C warmem Hybridisierungspuffer überführt, und der Puffer in der Hybridisierungsröhre durch diesen Sondenpuffer ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte dann ebenfalls bei 68°C über Nacht. Vor Immundetektion von RNA-RNA Hybriden wurden die Blots stringent zweimal für jeweils 20 min in 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 x SSC bei 68°C gewaschen. Zur Immunodetektion wurden die Blots zunächst zweimal für 5 min bei RT in 2 x SSC, 0,1 % SDS geschwenkt. Anschließend erfolgten 2 stringente Waschschritte bei 68°C in 0,1 x SSC, 0,1 % SDS für je 15 min. Die Lösung wurde anschließend durch Waschpuffer ohne Tween ersetzt. Es wurde 1 min geschüttelt und die Lösung durch Blocking-Reagenz ausgetauscht. Nach weiteren 30 min Schütteln wurden 10 µL Anti-Fluoreszein-Antikörperlösung hinzugefügt und weitere 60 min geschüttelt. Es folgten zwei 15 minütige Waschschritte in Waschpuffer mit Tween. Die Membran wurde anschließend 2 min in Substratpuffer äquilibriert und nach Abtropfen auf eine Kopierfolie überführt. Auf der "RNA-Seite" der Membran wurde dann ein Gemisch aus 20 µL CDP-Star™ und 2 mL Substratpuffer gleichmäßig verteilt. Im Anschluß wurde die Membran mit einer zweiten Kopierfolie abgedeckt und an den Rändern mit Hitze luftblasenfrei und wasserdicht verschweißt. Die Membran wurde dann in einer Dunkelkammer für 10 min mit einem Röntgenfilm bedeckt und dieser anschließend entwickelt. Je nach Stärke der Lumineszenzreaktion wurde die Belichtungszeit variiert.

Wenn nicht extra gekennzeichnet waren die Lösungen im Lieferumfang des Kits enthalten (*DIG-Luminescence detection Kit*,

Boehringer-Mannheim). Alle anderen wurden aus folgenden Stammlösungen durch Verdünnung mit autoklaviertem, destilliertem Wasser hergestellt. Alle Stammlösungen wurden, wenn nicht anders spezifiziert, mit DEPC (wie DEPC-Wasser) angesetzt und

5 anschließend autoklaviert.

- DEPC-Wasser: Destilliertes Wasser wird über Nacht bei 37°C mit Diethylpyrokarbonat (DEPC, 0,1 %, w/v) behandelt und anschließend autoklaviert
- 10 - 10 x MOPS-Puffer: 0,2 M MOPS (Morpholin-3-propansulfonsäure), 0,05 M Natriumacetat, 0,01 M EDTA, pH mit 10 M NaOH auf pH 7,0 eingestellt
- 15 - 20 x SSC (Natriumchlorid-Natriumzitrat, Salt-Sodiumcitrate): 3 M NaCl, 0,3 M triNatriumcitrat x 2 H₂O, pH mit 4 M HCl auf pH 7,0 eingestellt.
- 1 % SDS (Natriumdodecylsulfat, Sodiumdodecylsulfate) Natriumdodecylsulfat (w/v), ohne DEPC
- 20 - RNA-Probenpuffer: 760 µL Formamid, 260 µL Formaldehyd, 100 µL Ethidiumbromid (10 mg/mL), 80 µL Glycerol, 80 µL Bromphenolblau (gesättigt), 160 µL 10 x MOPS, 100 µL Wasser.
- 25 - 10 x Waschpuffer ohne Tween: 1,0 M Maleinsäure, 1,5 M NaCl; ohne DEPC, mit NaOH (fest, ca. 77 g) und 10 M NaOH auf pH 7,5 einstellen.
- 30 - Waschpuffer mit Tween: aus Waschpuffer ohne Tween mit Tween (0,3 %, v/v)
- 10 x Blockingreagenz: 50 g Blockingpulver (Boehringer-Mannheim) in 500 mL Waschpuffer ohne Tween suspendieren.
- 35 - Substratpuffer: 100 mM Tris (Trishydroxymethylamino-methan), 150 mM NaCl mit 4 M HCl auf pH 9,5 einstellen.
- 10 x Farbmarker: 50 % Glycerol (v/v), 1,0 mM EDTA pH 8,0, 0,25 % Bromphenolblau (w/v), 0,25 % Xylencyanol (w/v).

Eine BI1 Expression wurde wie beschrieben mit RT-PCR und cDNA Gelblots untersucht und ergab, dass BI1 überwiegend im Mesophyllgewebe von Blättern exprimiert wird, während Ubiquitin

konstitutiv gleichmäßig in Epidermis und Mesophyll exprimiert wird (Fig. 8).

Ferner ist eine Expression von BI1 als Reaktion auf Behandlung

5 der Pflanzen mit toxischen Kulturfiltraten von Bipolaris sorokiniana zu beobachten. Primärblätter der Gerste zeigen typische nekrotische Flecke (leaf spot blotch symptoms) nach Behandlung der Pflanzen mit toxischen Kulturfiltraten von Bipolaris sorokiniana (durchgeführt wie bei Kumar et al. 2001 10 beschrieben). Die Blattnekrosen waren erkennbar 48 h nach Behandlung. Der beobachtete Gewebeschaden war in der Bgh-resistanten Linie BCIngrid-mlo5 (I22) deutlicher ausgeprägt als in der Elterlinie Ingrid (Mlo-Genotype, Kumar et al. 2001). Die Expression von BI1 korreliert 72 h nach Behandlung (hat) mit der 15 Ausprägung der Blattnekrosen (Fig. 12).

Beispiel 7:

Die zur stabilen, mesophyll-spezifischen Überexpression wird der 20 Oxalat-Oxidase Promoter (germin 9f-2.8) aus Weizen eingesetzt. In Gerste ist die entsprechende Oxalat-Oxidase Expression Mesophyll-spezifisch, schwach konstitutiv und Pathogen-responsiv (Gregersen PL et al. (1997) Physiol Mol Plant Pathol 51: 85-97). Er kann deshalb zur Mesophyll-spezifischen Expression von BI1 25 genutzt werden. Zur Kontrolle wird HvBI1 unter Kontrolle des Mais-Ubiquitinpromoters (Christensen AH et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689) oder des Reis-Aktinpromoters überexprimiert (Zhang W et al. (1991) Plant Cell 3:1155-1165). Eingesetzt werden nachfolgende Konstrukte:

- 30 a) pUBiBI-1 (SEQ ID NO: 33; für transiente Gerstentransformation und Weizentransformation mit Partikel Bombardement. Expression von BI-1 unter Kontrolle des Mais Ubiquitin Promotors).
- 35 b) pLo114UbiBI-1 (SEQ ID NO: 34; erhalten durch Umklonierung der Ubi/BI-1 Expressionscassette als EcoR1-Fragment aus pUBiBI-1 in pLo114-GUS-Kan; Binärer Vektor für transiente Gerstentransformation mit *A. tumefaciens*)
- 40 c) pOXoBI-1 (SEQ ID NO: 35; Mesophyllspezifischer TaGermin 9f-2.8 Promoter vor BI1 zur Weizentrafo über Patikelbombardement.

d) pLo114OXoBI-1 (SEQ ID NO: 36)

Es werden Wildtypgerste und Weizen sowie mlo-Gerste transformiert, vermehrt und geselbstet. Die Transformation von 5 Gerste und Weizen erfolgt wie beschrieben (Repellin A et al. (2001) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 64: 159-183): Dazu werden Kalli aus unreifen Weizen- (bzw. Gersten-) embryonen über biolistischen Gentransfer mit Mikroprojektilen transformiert. Dabei werden pUC basierte Vektoren zusammen mit Vektoren die 10 Selektionsmarker tragen kotransformiert. Anschließend werden die Embryonen auf Selektionsmedium kultiviert und regeneriert. Gerste wird mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* transformiert. Dabei wird ein binärer Vektor auf Basis von pCambia_1301 eingesetzt. Unreife Embryonen von Gerste werden mit 15 A. *tumefaciens* cokultiviert, selektiert und anschließend regeneriert (Repellin A et al. (2001) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 64: 159-183; Horvath H et al. (2003) Proc Natl. Acad Sci USA 100: 365-369; Horvath H et al. (2002) in Barley Science, eds. Slafer, G. A., Molina-Cano, J. L., Savin, R., 20 Araus, J. L. & Romagosa, J. (Harworth, New York), pp. 143-176; Tingay S et al. (1997) Plant J. 11: 1369-1376).

Die transgenen (rekombinanten) Gersten- und Weizenpflanzen der T1 oder T2-Generation werden auf Resistenz gegenüber 25 hemibiotrophen und perthotrophen Erregern geprüft. Dazu werden die Blätter mit verschiedenen Pathogenen inkuliert. Als biotrophe Erreger werden Gerstenmehltau (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) und Braunrost (*Puccinia hordei*) verwendet. Als Maß der Mehltauanfälligkeit wird die Pustelzahl pro Blattfläche 5-7 Tage 30 nach Inkulation mit 2-5 Konidien pro mm² Blattfläche ausgewertet (Beßer K et al. (2000) Mol Plant Pathology 1: 277-286). Als hemibiotrophe Erreger werden *Bipolaris sorokiniana* n und *Magnaporthe grisea* verwendet. Die Inkulation erfolgt wie zuvor beschrieben (Kumar J et al. (2001) Phytopathology 91: 127-35 133; Jarosch B et al. (1999) Mol Plant Microbe Inter 12: 508-514). Als Maß für die Anfälligkeit dient die Anzahl und Größe der Blattläsionen 2 bis 6 Tage nach Sprühinkulation mit Konidien (Kumar J et al. (2001) Phytopathology 91:127-133; Jarosch B et al. (1999) Mol Plant Microbe Inter 12:508-514; 40 Jarosch B et al. (2003) Mol Plant Microbe Inter 16:107-114.). Als perthotropher Erreger wird *Fusarium graminearum* verwendet.

Zur Bestimmung der Fusarium Head Blight (FHB) Typ I-Resistenz werden Weizenähren in einem frühen Blühstadium mit einer

Makrokonidien-Suspension (ca. $2 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$) von *Fusarium graminearum* bzw. *Fusarium culmorum* besprüht. Die inkontrollierten Pflanzen werden für 3 Tage in eine Nebelkammer mit 25°C Lufttemperatur und 100% relativer Luftfeuchte transferriert.

- 5 Danach werden die Pflanzen im Gewächshaus unter Dauerlicht bei einer Temperatur von 20°C inkubiert und die Stärke der FHB-Symptome über die Ähre hinweg nach 5, 7 und 8 Tagen evaluiert.

Zur Quantifizierung der Fusarium Head Blight (FHB) Typ II-

- 10 Resistenz werden jeweils 10 - 20 µl Aliquots einer Makrokonidien-Suspension (ca. $2 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$) von *Fusarium graminearum* bzw. *Fusarium culmorum* in einzelne, relativ zentral gelegene Ährchen von Weizenpflanzen injiziert. Die inkontrollierten Pflanzen werden für 3 Tage in eine Nebelkammer mit 25°C Lufttemperatur und 100% relativer Luftfeuchte transferriert.
- 15 Danach werden die Pflanzen im Gewächshaus unter Dauerlicht bei einer Temperatur von 20°C inkubiert und die Ausbreitung der FHB-Symptome über die Ähre hinweg nach 7, 14 und 21 Tagen evaluiert. Die Ausbreitung der Symptome über die Ähre (das sog. *Fusarium-Spreading*) wird als Mass für die FHB Typ II-Resistenz genommen.

Vergleichsbeispiel 1: Transiente BI1 Expression in der Epidermis und Evaluation der Pilzpathogenentwicklung

- 25 Gerste cv Ingrid Blattsegmente wurden mit einer pGY-BI1 zusammen mit einem GFP-Expressionsvektor transformiert. Anschließend wurden die Blätter mit Bgh inkontrolliert und das Ergebnis nach 48 h mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Penetration in GFP-exprimierenden Zellen wurde mittels Detektion von Haustorien in lebenden Zellen und durch Bewertung der Pilzentwicklung aufin eben diesen Zellen beurteilt. Es wurde ein Verfahren zur transienten Transformation eingesetzt, das bereits für die biolistische Einführung von DNA und RNA in epidermale Zellen von Gerstenblättern beschrieben wurde (Schweizer P et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:647-54; Schweizer P et al. (2000) Plant J 2000 24:895-903).

- 40 Für Microcarrier-Präparation wurden 55 mg Wolframpartikel (M 17, Durchmesser 1,1 µm; Bio-Rad, München) zweimal mit 1 ml autoklaviertem Destilliertem Wasser und einmal mit 1 mL absolutem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 1 ml 50 %igem Glycerin aufgenommen (ca. 50 mg/ml Stammlösung). Die Lösung

wurde mit 50%igem Glycerin auf 25 mg/ml verdünnt, vor Gebrauch gut gemischt und im Ultraschallbad suspendiert.

- Zur Microcarrier-Beschichtung wurden pro Schuß 0,3 µg Plasmid pGFP (GFP unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors; Schweizer P et al. (1999) *Mol Plant-Microbe Interact* 12:647-654.), 0,7 µg Leervektor pGY bzw. pGY-BI1 (1 µL), 12,5 µl Wolframpartikel-Suspension (25 mg/ml; entsprechend 312 µg Wolframpartikel), 12,5 µl 1 M Ca(NO₃)₂-Lösung (pH 10) tropfenweise unter ständigem
5 Mischen zusammengegeben, 10 min bei RT stehengelassen, kurz zentrifugiert und 20 µl vom Überstand abgenommen. Der Rest mit den Wolframpartikel wird resuspendiert (Ultraschallbad) und ins Experiment eingesetzt.

10 15 Es wurden ca. 4 cm lange Segmente von Gerstenprimärblättern verwendet. Die Gewebe wurden auf 0,5 % Phytagar (GibcoBRL™ Life Technologies™, Karlsruhe) mit 20 µg/ml Benzimidazol in Petrischalen (6,5 cm Durchmesser) gelegt und direkt vor dem Partikelbeschuss an den Rändern mit einer Schablone mit einer
20 rechteckigen Aussparung von 2,2 cm x 2,3 cm abgedeckt. Die Schalen wurden nacheinander auf den Boden der Vakuumkammer (Schweizer P et al. (1999) *Mol Plant Microbe Interact* 12:647-54) gestellt, über dem ein Nylonnetz (Maschenweite 0,2 mm, Millipore, Eschborn) als Diffusor auf einer Lochplatte
25 eingeschoben war (5 cm über dem Boden, 11 cm unterhalb des Macrocarriers, s.u.), um Partikelklumpen zu zerstreuen und den Partikelstrom abzubremsen. Der oben an der Kammer angebrachte Macrocarrier (Plastik-Sterilfilterhalter, 13 mm, Gelman Sciences, Swinney, UK) wurde je Schuss mit 5,8 µL DNA-
30 beschichteten Wolframpartikeln (Macrocarrier, s.u.) beladen. Mit einer Membranvakuumpumpe (Vacuubrand, Wertheim) wurde der Druck um 0,9 bar in der Kammer reduziert und die Wolframpartikel mit 9 bar Heliumgasdruck auf die Oberfläche des Pflanzengewebes geschossen. Sofort danach wurde die Kammer belüftet. Zur
35 Markierung transformierter Zellen wurden die Blätter mit dem Plasmid (pGFP; Vektor auf pUC18-Basis, CaMV 35S-Promoter/Terminator-Kassette mit insertiertem GFP-Gen; Schweizer P et al. (1999) *Mol Plant Microbe Interact* 12:647-54; zur Verfügung gestellt von Dr. P. Schweizer, Institut für Pflanzenbiologie IPK, Gatersleben, Deutschland) beschossen.
40 Vor dem Schießen eines anderen Plasmids wurde der Macrocarrier jeweils gründlich mit Wasser gereinigt. Nach vierstündiger Inkubation nach dem Beschuß bei leicht geöffneten Petrischalen, RT und Tageslicht wurden die Blätter mit 100 Konidien/mm² des

Echten Gerstenmehltaupilzes (Rasse A6; *Blumeria graminis f.sp. hordei* Mehltau A6) inkuliert und für weitere 40 h unter gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde die Penetration ausgewertet. Das Ergebnis (z.B. die

- 5 Penetrationseffizienz, definiert als prozentualer Anteil angegriffener Zellen, die ein mit reifem Haustorium und einer Sekundärhyphae ("secondary elongating hyphae"), wurde mittels Fluoreszens- und Lichtmikroskopie analysiert. Eine Inkulation mit 150 Conidia/mm² ergibt eine Angriffs frequenz von ca. 50 %
- 10 der transformierten Zellen. Für jedes einzelne Experiment wurde eine minimale Anzahl von 100 Interaktionsstellen ausgewertet. Transformierte (GFP exprimierende) Zellen wurden unter Anregung mit blauem Licht identifiziert. Drei verschiedene Kategorien von transformierten Zellen konnten unterschieden werden:

- 15 1. Penetrierte Zellen, die ein leicht erkennbares Haustorium beinhalten. Eine Zelle mit mehr als einem Haustorium wurde als eine Zelle gewertet.
- 20 2. Zellen, die durch ein Pilz-Appressorium zwar angegriffen wurden, aber kein Haustorium beinhalten. Eine Zelle die mehrfach von Bgh angegriffen wurden, aber kein Haustorium enthält, wurde als eine Zelle gewertet.
- 25 3. Zellen die nicht durch Bgh angegriffen sind.

Stomatazellen und Stomatanebenzellen wurden von der Bewertung ausgeschlossen. Oberflächenstrukturen von Bgh wurden mittels Lichtmikroskopie oder Fluoreszenzfärbung des Pilzes mit 0,3 % Calcofluor (w/v in Wasser) für 30 sec analysiert. Die Entwicklung des Pilzes kann leicht durch Fluoreszenzmikroskopie nach Anfärbung mit Calcofluor evaluiert werden. In BI1-dsRNA transformierten Zellen entwickelt der Pilz zwar ein primäres und ein appressoriales Keimschlauch ("Germ-Tube") aber kein Haustorium. Haustoriumausbildung ist eine Vorbedingung für die Bildung einer Sekundärhyphae.

40 Die Penetrationseffizien (Penetrationsraten) errechnet sich als Anzahl der penetrierten Zellen durch Anzahl der attackierten Zellen multipliziert mit 100.

Die Penetrationseffizien dient der Bestimmung des Suszeptibilität von Zellen, die mit pGY-BI1 transfiziert sind im Vergleich zu Zellen die mit einer Leervektorkontrolle transformiert sind

- (Fig. 10). Es wurde beobachtet, dass die BI1 Überexpression die Penetrationshäufigkeit von Bgh signifikant erhöht (Fig. 10). In sechs unabhängigen Experimenten bewirkte die Überexpression in der suszeptiblen Gerstensorte Ingrid eine signifikante Erhöhung
5 der durchschnittlichen Penetrationseffizienz (PE) von 47 % auf 72 % (165 % der Kontrollen) bei Zellen die BI1 überexprimieren im Vergleich zu Zellen, die mit Leervektor transformiert wurden (Kontrolle) (Fig. 10).
- 10 Ferner wurden epidermale Zellen der Bgh-resistenten *mlo5*-Gerste mit dem BI1 Überexpressionskonstrukt pGY-1 wie oben beschrieben transient transformiert. Der *mlo5*-Genotyp in einem Pallas bzw. Ingrid Hintergrund zeigt eine geringfügige Anfälligkeit gegen Bgh. In 7 unabhängigen Experimenten wurde in Kontrollpflanzen
15 (Transformation mit Leervektor und GFP-Vektor) eine Penetrationseffizienz von minimal 0 bis maximal 11 % gefunden. Überraschenderweise ergab eine BI1 Überexpression (pGY-BI1) eine nahezu vollständige Rekonstitution der suszeptiblen Phänotyps, d.h. es erfolgte ein nahezu kompletter Bruch der *mlo*-Resistenz.
20 Die durchschnittliche Penetrationseffizienz von Bgh auf Ingrid-*mlo5* und Pallas-*mlo5* Blattsegmenten steigt von 4 % auf 23 %, bzw. von 6 % auf 33 % (Fig. 11). Dies bedeutet einen relativen Anstieg der Penetration auf 520 % bzw. 510 % der Kontrollen. Des Weiteren erhöhte die Überexpression von BI1 im Gerste cv
25 Manchuria die Anfälligkeit gegen das Weizenpathogen *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* in drei unabhängigen Experimenten von 0 bis 4 % auf 19 bis 27 % (Fig. 13).

Patentansprüche

1. Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen mindestens einen biotischen oder abiotischen Streßfaktor in Pflanzen, wobei nachfolgende Arbeitsschritte umfasst sind
 - a) Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion mindestens eines Bax Inhibitor-1 (BI1) Proteins in mindestens einem pflanzlichen Gewebe mit der Maßgabe, dass die Expression in der Blattepidermis im wesentlichen unverändert bleibt oder reduziert wird, und
 - b) Auswahl der Pflanzen, bei denen im Vergleich zur Ausgangspflanze eine Resistenz gegen mindestens einen biotischen oder abiotischen Streßfaktor besteht oder erhöht ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Streßfaktor ein pflanzliches Pathogen ist.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei der Streßfaktor ein nekrotropes oder hemibiotropes Pathogen ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das BI-1 Protein mindestens eine Sequenz umfasst, die eine Homologie von mindestens 50% aufweist zu mindestens einem BI1-Konsensusmotiv ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
 - a) H(L/I)KXYY,
 - b) AXGA(Y/F)XH,
 - c) NIGG,
 - d) P(V/P)(Y/F)E(E/Q)(R/Q)KR,
 - e) (E/Q)G(A/S)S(V/I)GPL,
 - f) DP(S/G)(L/I)(I/L),
 - g) V(G/A)T(A/S)(L/I)AF(A/G)CF(S/T),
 - h) YL(Y/F)LGG,
 - i) L(L/V)SS(G/W)L(S/T)(I/M)L(L/M)W, und
 - j) DTGX(I/V)(I/V)E.

100

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das BI-Protein kodiert wird durch ein Polypeptid, das mindestens eine Sequenz umfaßt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
 - 5 a) den Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 oder 38, und
 - 10 b) Sequenzen, die eine Identität von mindestens 50% zu einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 oder 38 aufweisen,
 - 15 c) Sequenzen die mindestens eine Teilsequenz von mindestens 10 zusammenhängenden Aminosäureresten einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 oder 38 umfassen.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion mindestens eines BI1-Proteins durch rekombinante Expression des besagten BI1-Proteins unter Kontrolle eines wurzel-, knollen- oder mesophyll-spezifischen Promotors realisiert wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, umfassend
 - 25 a) stabile Transformation einer pflanzlichen Zelle mit einer rekombinanten Expressionskassette enthalten eine für ein BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz in funktioneller Verknüpfung mit einem gewebespezifischen Promotor, wobei der Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist und wobei der Promotor in Bezug auf die besagte das BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz heterolog ist.
 - 35 b) Regeneration der Pflanze aus der pflanzlichen Zelle, und
 - 40 c) Expression besagter für ein BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz in einer Menge und für eine Zeit hinreichend um eine Stress- und/oder Pathogenresistenz in besagter Pflanze zu erzeugen oder zu erhöhen.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Pflanze aus den monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen ausgewählt ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe der monokotyledonen Pflanzen bestehend aus Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen oder Zuckerrohr.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Expression des Bax Inhibitor-1 (BI-1) im Mesophyll erhöht wird.

10 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Pflanze einen mlo-resistenten Phänotyp aufweist, oder die Expression oder Funktion von MLO, RacB und/oder NaOx mindestens in der Epidermis inhibiert oder im Vergleich zu einer Kontrollpflanze reduziert ist und/oder die Expression oder Funktion von PEN2, SNAP34 und/oder PEN1 mindestens in der Epidermis erhöht wird im Vergleich zu einer Kontrollpflanze.

20 12. Polypeptidsequenz kodierend für BI1 Protein umfassend mindestens eine Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

a) den Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30, 32 oder 38,

25 b) Sequenzen die eine Homologie von mindestens 90%, bevorzugt mindestens 95%, besonders bevorzugt mindestens 98% zu einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30, 32 oder 38 aufweisen, und

30 c) Sequenzen die mindestens 10, bevorzugt mindestens 20, besonders bevorzugt mindestens 30 zusammenhängende Aminosäuren einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30, 32 oder 38 umfassen.

35 13. Nukleinsäuresequenz kodierend für eine Polypeptidsequenz gemäß Anspruch 12.

40 14. Rekombinante Expressionskassette enthalten eine für ein BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz in funktioneller Verknüpfung mit einem gewebespezifischen Promotor, wobei der Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist und wobei der Promotor in Bezug auf die besagte das BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz heterolog ist.

15. Rekombinante Expressionskassette nach Anspruch 14, wobei
- a) das BI1-Protein wie in einem der Ansprüche 4, 5 oder 11 definiert ist, und/oder

5

- b) der gewebespezifische Promotor ausgewählt ist aus der Gruppe der wurzel-, knollen- oder mesophyllspezifischen Promotoren.

10 16. Rekombinanter Vektor enthaltend eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 14 oder 15.

15 17. Rekombinanter Organismus enthaltend mindestens eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 14 oder 15 und/oder mindestens einen Vektor gemäß Anspruch 16.

18. Rekombinanter Organismus nach Anspruch 17 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bakterien, Hefen, nicht-menschlichen Tieren und Pflanzen.

20

19. Rekombinanter Organismus nach Anspruch 17 oder 18, ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzen bestehend aus Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen, Zuckerrohr, Raps, Kresse, Arabidopsis, Kohlarten, Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen, Erdnuß, Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine, Paprika, Sonnenblume, Tagetes, Salat, Calendula, Melone, Kürbis und Zucchini.

25

30 20. Rekombinanter Organismus nach einem der Ansprüche 17 bis 19, wobei der Organismus eine Pflanze ist, die zusätzlich einen mlo-resistenten Phänotyp aufweist.

		50
1	AtBI-1	(1) -----MDAFSSFFDSQPGS---RSWSYDSLKNFRQISPQAVQNHLKR
	BnBI-1	(1) -----MDSFSSFFDSQPGS---RSWSYDSLKNLRQISPQVQNHLKR
	GmBI2	(1) -----RLQAMDAFNNSFFDS-----RNRWNYDTLKNFRQISPQVQNHLKQ
	GmBI3	(1) ITKTIRFDLSFSMDTFFKSPSSSSRSRWSYDTLKNFRQISPQVQNHLKL
	HvBI-1	(1) -----MDAFYSTS---SAAASGWGHDSLKNFRQISPQAVQSHLKL
	NtBI-1	(1) -----MESCTSFFNSQSASS-RNRWSYDSLKNFRQISPQVQTHLKK
	OsBI-1	(1) -----MDAFYSTSSAYGAAASGWGYDSLKNFRQISPQAVQSHLKL
	TaBI11	(1) -----
	TaBI18	(1) -----FSGTFRNSRSDDFVLCELQRELPRCRDATALTV
	TaBI5 neu	(1) -----VAMPGR
	ZmBI14	(1) -----
	ZmBI16	(1) -----
	ZmBI33	(1) -----
	ZmBI8	(1) -----
	Consensus	(1) F S W YDSLKN R ISP VQ HLK
		51
	AtBI-1	(39) VYLTLCALVASAFGAYLHVLWNIGGILTTIGCIGTMIWLLSCPPYEHQK
	BnBI-1	(39) VYLTLCALVASAFGAYLHVLWNIGGILTTIGCFGSMIWLLSCPPYEQQK
	GmBI2	(40) VYFTLCFAVVAAVGAYLHVLLNIGGFLTTVACMGSSFWLLSTPPFEERK
	GmBI3	(51) VYFTLCACVVAAVGAFLHVWNIGGFLTTLASIGSMFWLLSTPPFEEQK
	HvBI-1	(37) VYLTLCFALASSAVGAYLHIALNIGGMLTMLACVTIAWMFSVPVYEERK
	NtBI-1	(41) VYLSLCALVASAAGAYLHILWNIGGLLTLGCVGSIVWLMATPLYEEQK
	OsBI-1	(40) VYLTLCVALAASAVGAYLHVWNIGGMLTMLGCVGSIAWLFSVPVFEERK
	TaBI11	(1) -----
	TaBI18	(33) VYVIPIVGRIKSAAAGAYLHIALNIGGMLTMLACIGTIAWMFSVPVYEERK
	TaBI5 neu	(7) RFRLYALPGLICRGCLPAHCPEHWRDADNARVYRNHRLDVLGASLRGE
	ZmBI14	(1) -----GSIAWLFSVPVYEERK
	ZmBI16	(1) -----WNIGVRLTMLGCIGSIDWLFSVPVYEERK
	ZmBI33	(1) -----WNIGGTLTMLGCVGSIAWLFSVPVYEERK
	ZmBI8	(1) -----
	Consensus	(51) VY TLC AL ASA GAYLHV NIGG LT LGCIGSI WL S PVYEERK
		100
	AtBI-1	(89) RLSLLFVSAVLEGASVGPLIKVAIDVDPSILITAFVGTAIAFVCFSAAM
	BnBI-1	(89) RLSLLFLSAVLEGASVGPLIKVAVDFDPSILITAFVGTAIAFICFSGAAM
	GmBI2	(90) RVTLLMAASLFQGSSIGPLIDLAIHIDPSLIFSAFVGTAIAFACFSGAAL
	GmBI3	(101) RLSLLMASALFQGASIGPLIDLAFAIDPGLIIGAFVATSLAFACFSAVAL
	HvBI-1	(87) RFGLLMGAALLEGASVGPLIELAIDFDPSILVTGFVGTAIAFGCFSGAAI
	NtBI-1	(91) RIALLMAAALFKGASIGPLIELAIDFDPSIVIGAFVGCAVAFGCFSAAM
	OsBI-1	(90) RFGILLAAALLEGASVGPLIKLAVDFDSSILVTAFVGTAIAFGCFTCAAI
	TaBI11	(1) -----AAI
	TaBI18	(83) RFGLLMGAALLEGASVGPLIELAIDFDPSILVTGFVGTAIAFGCFSGAAI
	TaBI5 neu	(57) EVWAADGCSLLEGASVGPLIELAIDFDPSILVTGFVGTAIAFGCFSGAAI
	ZmBI14	(17) RYWLLMAAALLEGASVGPLIKLAVEFDPSILVTAFVGTAIAFACFSCAAM
	ZmBI16	(30) RYGLLMAAALLEGASVGPLVKLAVEFDPSILVTAFVGTAIAFACFSGAAM
	ZmBI33	(30) RYGLLMAAALLEGASVGPLVKLAVEFDPSILVTAFVGTAIAFACFSGAPW
	ZmBI8	(1) -----VIDLDSRILVTAFVGTAIAFACFSGAAI
	Consensus	(101) R LLMAAALLEGASVGPLI LAIDFDPSILVTAFVGTAIAFACFSGAAI

Fig.1a

		151	200
AtBI-1	(139)	LARRREYLYLGGLLSSGLSMLWLFQFASSIFG-GSASIFKFELYFGLLIF	
BnBI-1	(139)	LARRREYLYLGGLLSSGLSMLWLFQFASSIFG-GSASIFKFELYFGLLIF	
GmBI2	(140)	VARRREYLYLGGLVSSGLSILLWLHFASSIFG-GSTALFKFELYFGLLVF	
GmBI3	(151)	VARRREYLYLGGLLSSGLSILLWLHSDSSLFG-GSIALFKFELYFGLLVF	
HVBI-1	(137)	IAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFVTISIFGHSS-GSFMFEVYFGLLIF	
NtBI-1	(141)	VARRREYLYLGGLLSSGLSILFWLHFASSIFG-GSMALFKFEVYFGLLVF	
OsBI-1	(140)	VAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFAASIFGHST-GSFMFEVYFGLLIF	
TaBI11	(4)	IAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFATSISIFGHSS-GSFMFEVYFGLLIF	
TaBI18	(133)	IAKRREYLYLGGLLSSG-----LTIL	
TaBI5 neu	(107)	IAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFATSISIFGHSS-GSFMFEVYFGLLIF	
ZmBI14	(67)	VAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFAASIFGHQSTSSFMFEVYFGLLIF	
ZmBI16	(80)	VARRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQLAASIF-GHSATSFMEVYFGLLIF	
ZmBI33	(80)	WQAR-EYLYLGGCSRRGSPSCSGCSSPPPSS--ALRNSFMFEVYFGLLIL	
ZmBI8	(29)	IAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFATSISIFGHTS-ATFMFELYFGLLVF	
Consensus	(151)	VAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFASSIFG S ASFMFEVYFGLLIF	
		201	250
AtBI-1	(188)	VGYMVVDTQEIIIEKAHLGMDYVKHSLTLFTDFVAVFVRILIIMLKNSAD	
BnBI-1	(188)	VGYMVVDTQDIIIEKAHLGMDYVKHSLTLFTDFVAVFVRVLIIMLKNSAD	
GmBI2	(189)	VGYIVVDTQEIIVERAHLGDLDYVKHALTLFTDLAVFVRILVIMLKNSSTE	
GmBI3	(200)	VGYVIVDTQEIIIERAHFGDLDYVKHALTLFTDLAAIFVRILIIMLKNSSE	
HVBI-1	(186)	LGYMYVDTQEIIIERAHGDMDYIKHALTLFTDFVAVLVRVLIIMLKNAGD	
NtBI-1	(190)	VGYIIFDTQDIIIEKAHLGDLDYVKHALTLFTDFVAVFVRILIIMLKNSAD	
OsBI-1	(189)	LGYMYVDTQEIIIERAHGDMDYIKHALTLFTDFVAVLVRVLIIMLKNSAD	
TaBI11	(53)	LGYMYVDTQEIIIERAHGDMDYIKHALTLFTDFVAVLVRVLIIMLKNAGD	
TaBI18	(154)	L-----	
TaBI5 neu	(156)	LGYMYVDTQEIIIERAHGDMDYIKHALTLFTDFVAVLVRVLIIMLKNAAD	
ZmBI14	(117)	LGYMYVDTQEIVIERAHHG-----	
ZmBI16	(129)	LGYYVYDT-----	
ZmBI33	(127)	LG-----	
ZmBI8	(78)	LGYMFDTQEIIIERAHRGDMDYIKHALTLFTDFVAVLVRVLIIMMKNAQE	
Consensus	(201)	LGYMYVDTQEIIERAH GDMDYIKHALTLFTDFVAV VRVLIIMLKNA D	
		251	300
AtBI-1	(238)	KEEKKKRNRN-----GDVK-I-LYGCYRVWPL-RYLLALSIGDQTCF	
BnBI-1	(238)	KEDKKKRRRN----D-KVRKKAK-SGCYVCFKK-----KRVG	
GmBI2	(239)	RNEKKKKRND-----	
GmBI3	(250)	RNEKKKKRND--ADRPTRAQASLQ-FSLWRIHN-----LFR-CWSLV-	
HVBI-1	(236)	KSEDKKKRKRG-----S-----	
NtBI-1	(240)	KEEKKKRNRN---CISGYSKTL-L-NLAFSCS---TSVDLRQVCC--FG	
OsBI-1	(239)	KSEEKKRKRS-ELLFPLCT-EKTTAAIASTYYDRAALQLGFMVNTSSFA	
TaBI11	(103)	KSEDKKKRKRS-----	
TaBI18	(155)	-----	
TaBI5 neu	(206)	KVGGQEEEEKS-----	
ZmBI14	(135)	-----	
ZmBI16	(137)	-----	
ZmBI33	(129)	-----	
ZmBI8	(128)	KSQDEKKRK-----	
Consensus	(251)	K E KKKRR	

Fig.1b

	301	350
AtBI-1	(278) H-KG-SACFTSAQVPSSDCK-----	LECCSSFHKLLFFKSL
BnBI-1	(269) VISTDMIALVFFTCLSEQFW-----	QHTLRICVFLLVTPDCEWI
GmBI2	(249) -----	-----
GmBI3	(288) LVSYVFAVMVNRISFKHLHMYLPIS-CVV-HHTLV-KKKKKKKKKKKKK	
HvBI-1	(248) -----	-----
NtBI-1	(279) NASD-AARLCYAAQCQCGYGGT-MVLF---PKHTIK-HACLHYIDNLRVY	
OsBI-1	(287) FC-YGVNLLRFVVVVALQILACYMTRIFL-WWSR-SKRENTSSFATNLFA	
Consensus	(301)	
	351	400
AtBI-1	(312) VLLIASYQAKNNVGK-----	SCLNFLKCVHFRKKKKKKKK-----
BnBI-1	(307) SILKLC-KLSVGS-----	-----
GmBI2	(249) -----	-----
GmBI3	(335) KKKKKXXXXXXXXXXXX--XXXXXGVCGLRYSRHSSNH-EGSLW-PGLC-	
HvBI-1	(248) -----	-----
NtBI-1	(322) YLFLLPFAVLGCS-LYS-FSVMLDHLLS-RLISHIDGRNENSHRRPNLFK	
OsBI-1	(334) FW-LMMILSPKKKK-----	-----
Consensus	(351)	
	401	450
AtBI-1	(348) -----	-----
BnBI-1	(319) -----	-----
GmBI2	(249) -----	-----
GmBI3	(380) ACIDTVH-FGCNLICANS-YNVE-FI-EK-EEEEERLIG-PIAMCRVIWFV	
HvBI-1	(248) -----	-----
NtBI-1	(369) TEAQL-----	-----
Consensus	(401)	
	451	500
GmBI3	(424) ENT-LAV-KLLVPLCS--LAMCLL-W-MSGFLLNIFICIC--S-YIV-TS	
Consensus	(451)	
	501 512	
GmBI3	(464) FLGLKKEKKKKK	
Consensus	(501)	

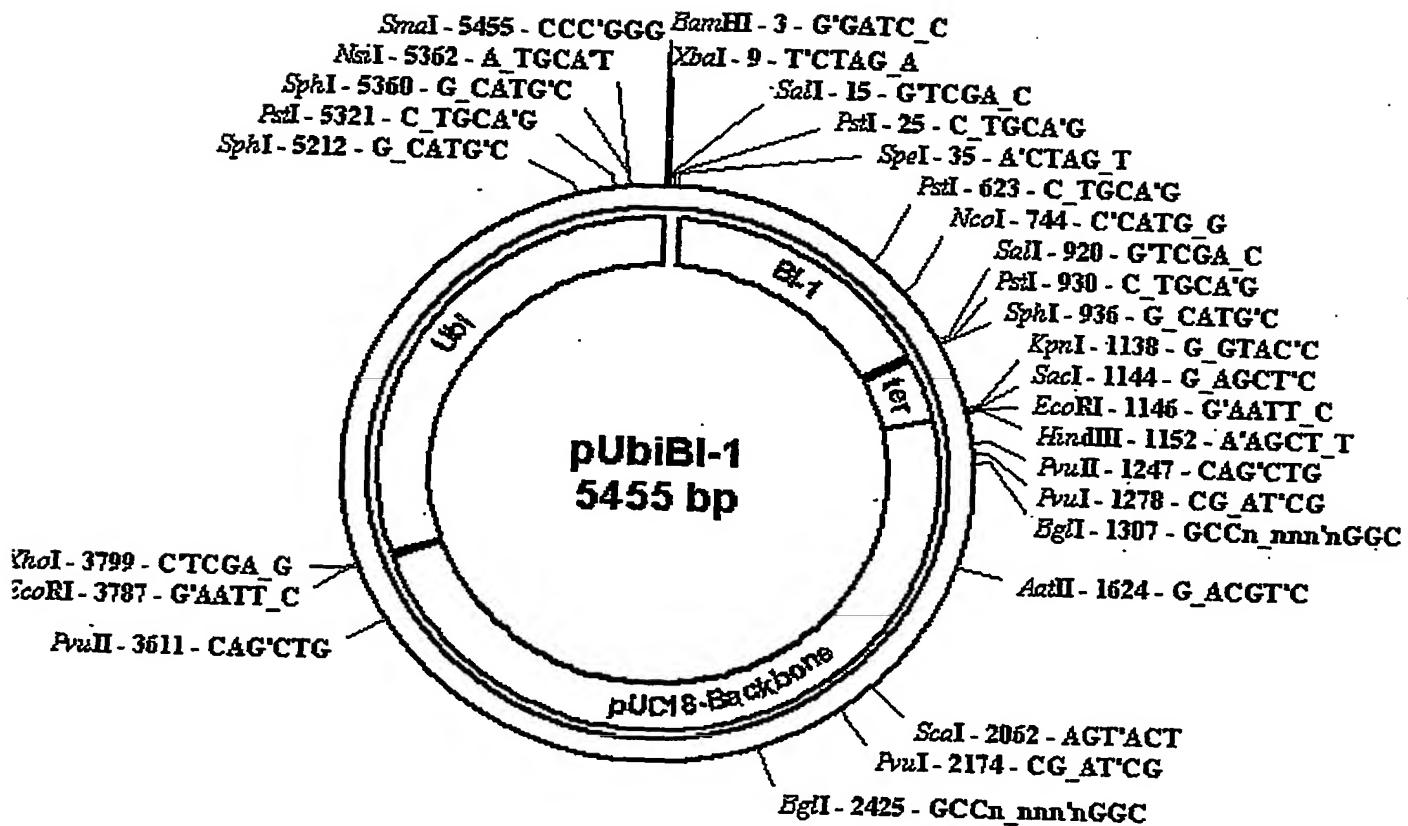
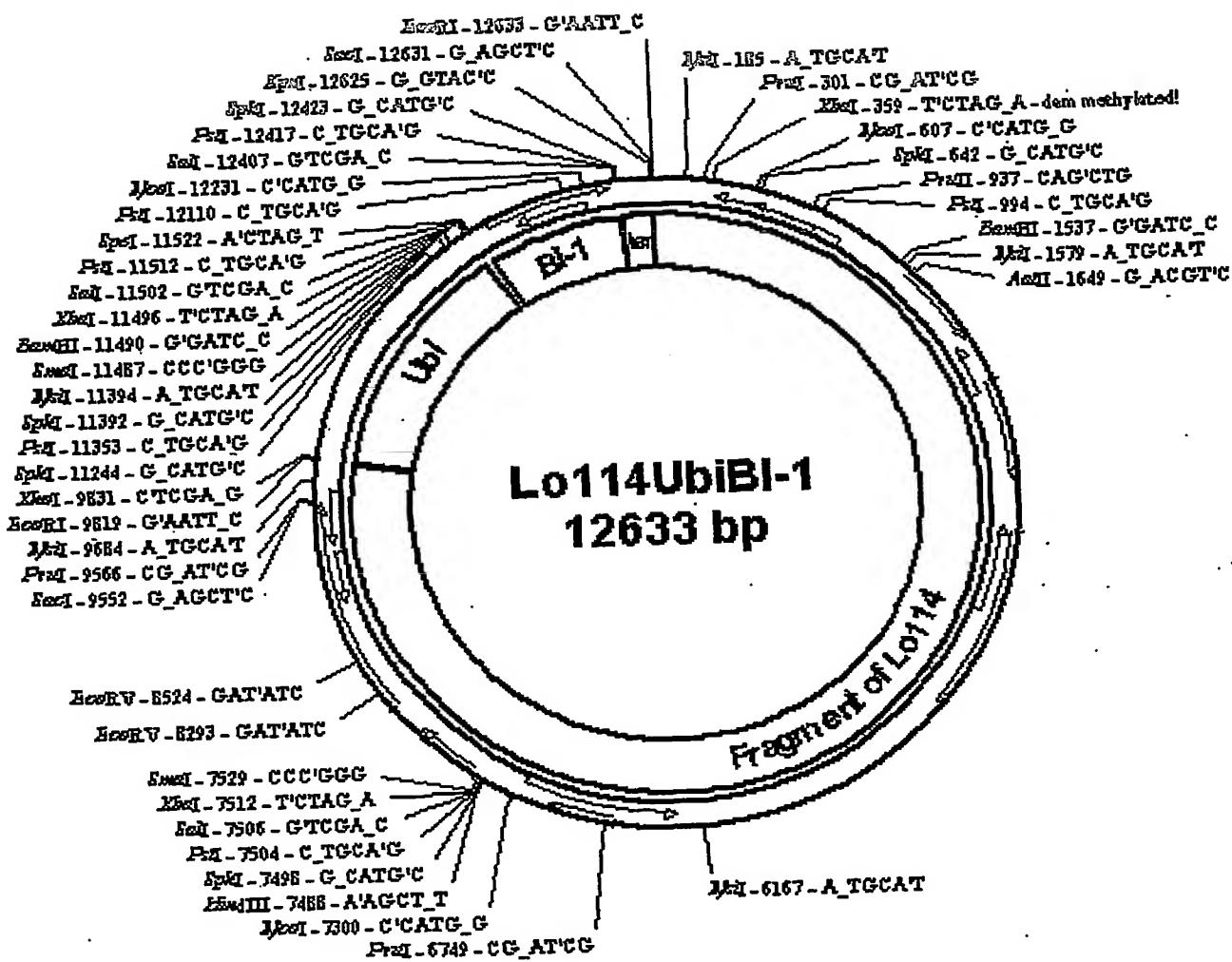


Fig. 2

**Fig. 3**

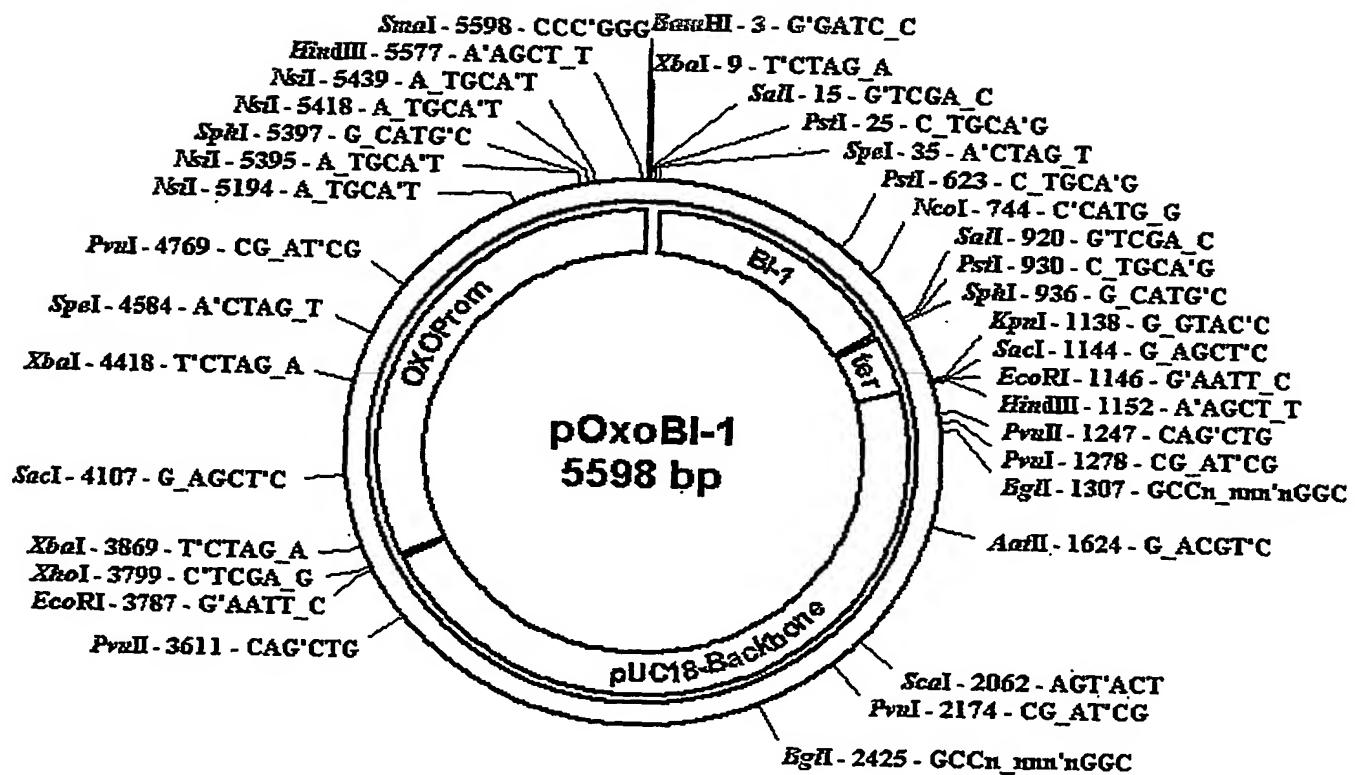
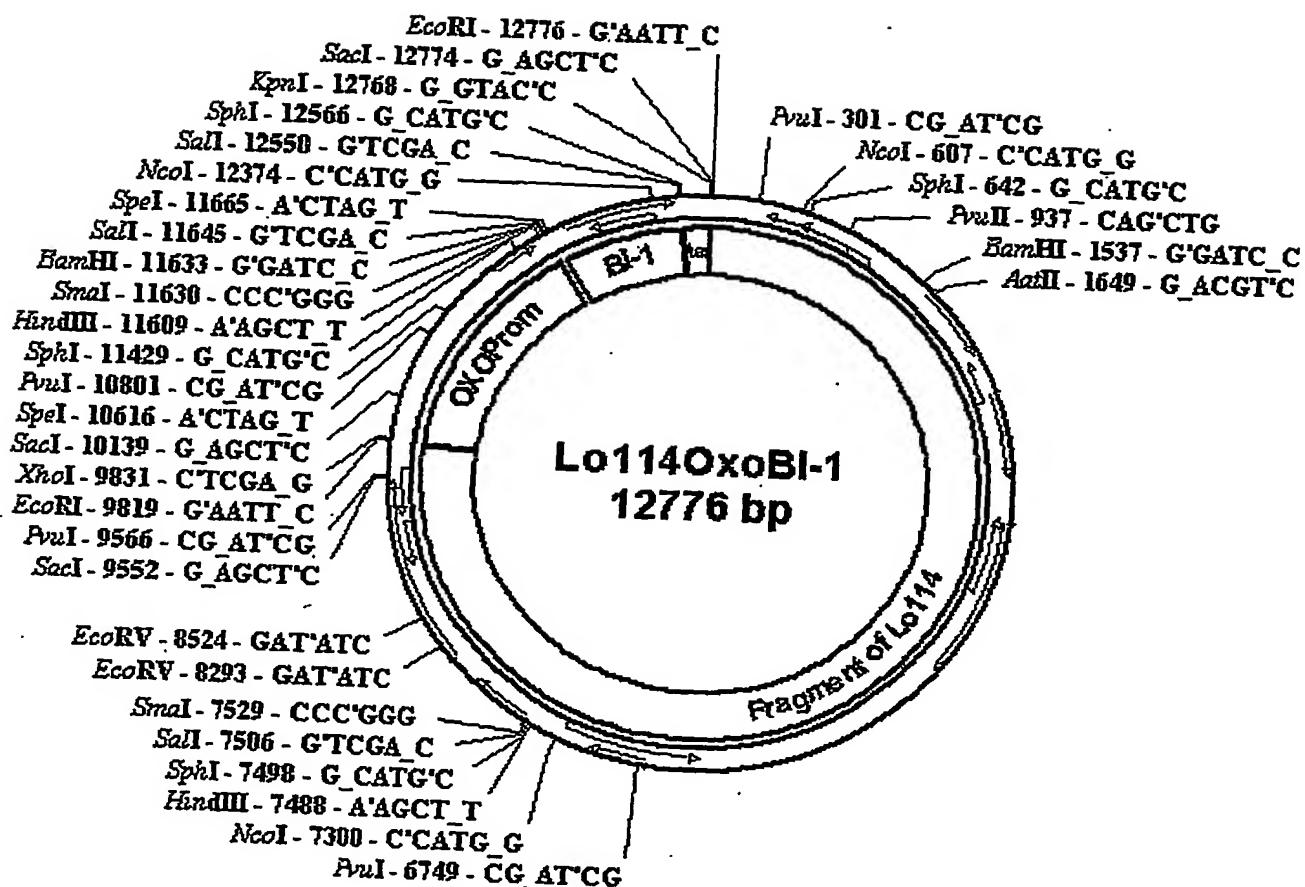


Fig. 4

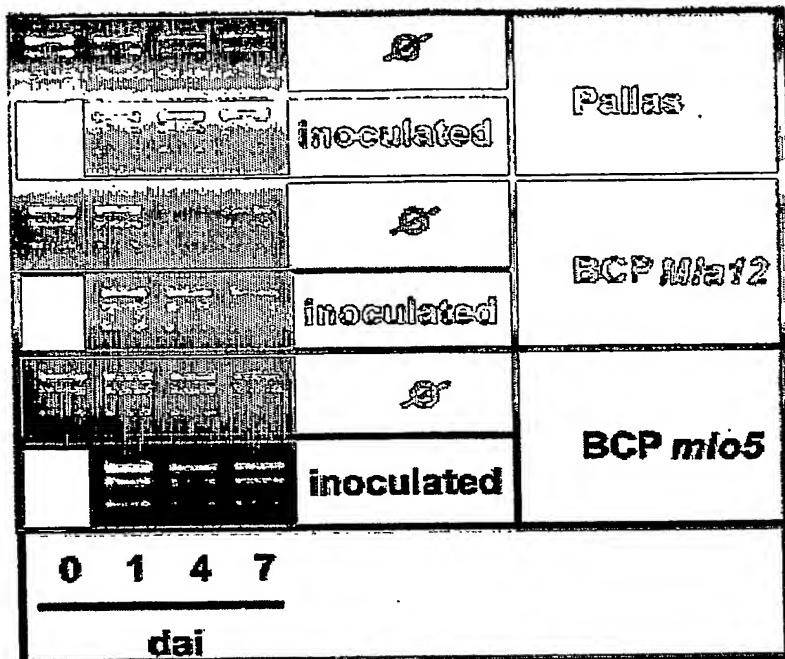
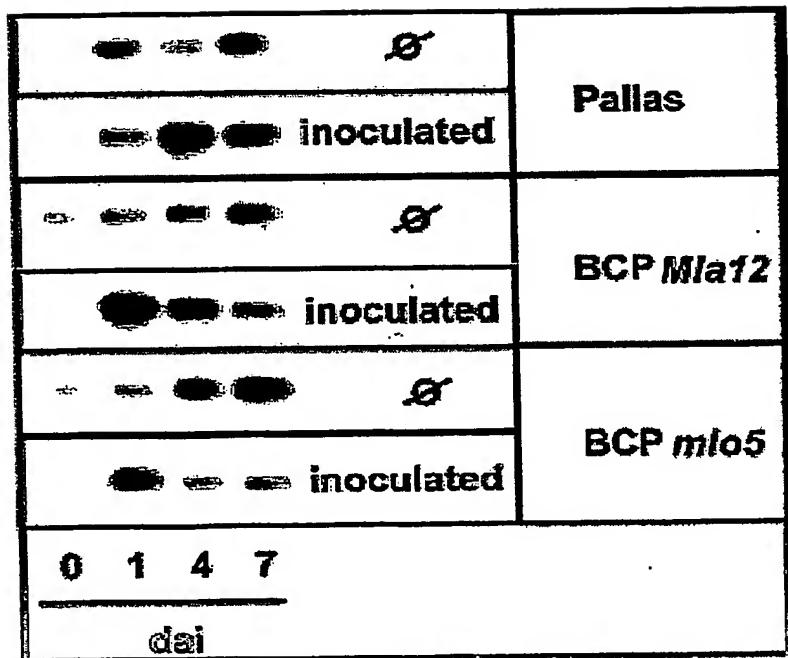
**Fig.5**

BEST AVAILABLE COPY

<i>H. vul.</i>	MDAFYSTSS--AASGAGHDLSKFRQSPAVASHRQLVLLTLCPIIASSTVCGHIA	57
<i>O. sat.</i>	MDAFYSTSSAYGAAASGAGGYLSKFRQSPAVASHRQLVLLTLCPIIASSTVCGHIA	60
<i>A. tha.</i>	MDAIPSSFFDS-OPGSRSSTSDSILKAFRGISPAVASHRQLVLLTLCPIIASSTVCGHIA	59
<i>H. sap.</i>	MNIFDRKIN-----FIALLKPSHITESTCOHKKVYASFALCHFVAEAGAVVHV	50
<i>H. vul.</i>	LN--IGGELTHLACVGTIAWLFSPVYEE--RKRFGLLEGABLEGASYGPTEHLADIDFD	113
<i>O. sat.</i>	LN--IGGELTHLACVGTIAWLFSPVYEE--RKRFGLLAADLLEGASYGPTEHLADIDFD	116
<i>A. tha.</i>	WN--IGGELTHIGGIGITMIWLLSCPPYEH--QKRLSLLFVSAVLEGASYGPTEHLADIDFD	115
<i>H. sap.</i>	THFTQAGILLSALGSLILMILMATEPESHETEOKRLGLLAGFELIGVGLCPALEFCIAVN	110
<i>H. vul.</i>	PSILWTGFUGTMLDFGCFSGAPITIIPKRREYLVLGGELSSGLSILLMLQLOVTSIFGHSSGS	173
<i>O. sat.</i>	SSILVTAFVGTMLDFGCFTCDFIVPKRREYLVLGGELSSGLSILLMLQLOVTSIFGHSTGS	176
<i>A. tha.</i>	PSILITAFAFGTMLDFFWCFSAAAMLRREEYLELGGELSSGLSILLMLQLOVTSIFGGSASI	175
<i>H. sap.</i>	PSILPTAFAFGTEMIFCFILSMLVARRESYLELGGELSSGLSILLMLQLOVTSIFGGSASI	169
<i>H. vul.</i>	FMEIIVYEGLIIELGYYVWDTCIIEKAEHGDDYIKHAIILFTDFIATWLAVVLLTLEKNA	233
<i>O. sat.</i>	FMEIIVYEGLIIELGYYVWDTCIIEKAEHGDDYIKHAIILFTDFIATWLAVVLLTLEKNA	236
<i>A. tha.</i>	FKEIIVYEGLIIELGYYVWDTCIIEKAEHGDDYIKHAIILFTDFIATWLAVVLLTLEKNA	235
<i>H. sap.</i>	FOANLIVVGLVVVMCGFVLDTGLIIEKAEHGDDYIKHAIILFTDFIATWLAVVLLTLEKNA	229
<i>H. vul.</i>	GDESEDKBKRKRGS 247	
<i>O. sat.</i>	SDRSEEEKKRKKPS- 249	
<i>A. tha.</i>	ADH-EKRRKRRN- 247	
<i>H. sap.</i>	KDF-KREKK--- 237	

Fig. 6

BEST AVAILABLE COPY

rRNAs**Bl-1****Fig.7**

BEST AVAILABLE COPY

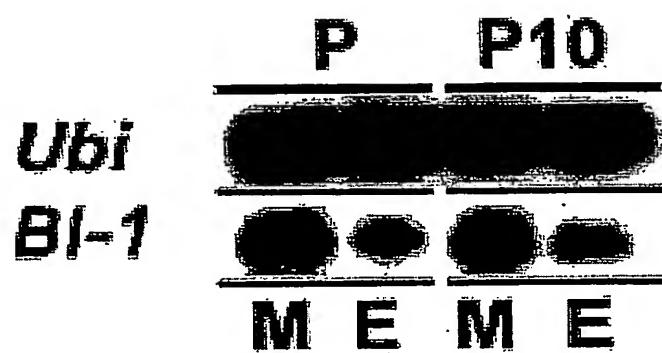


Fig.8

BEST AVAILABLE COPY

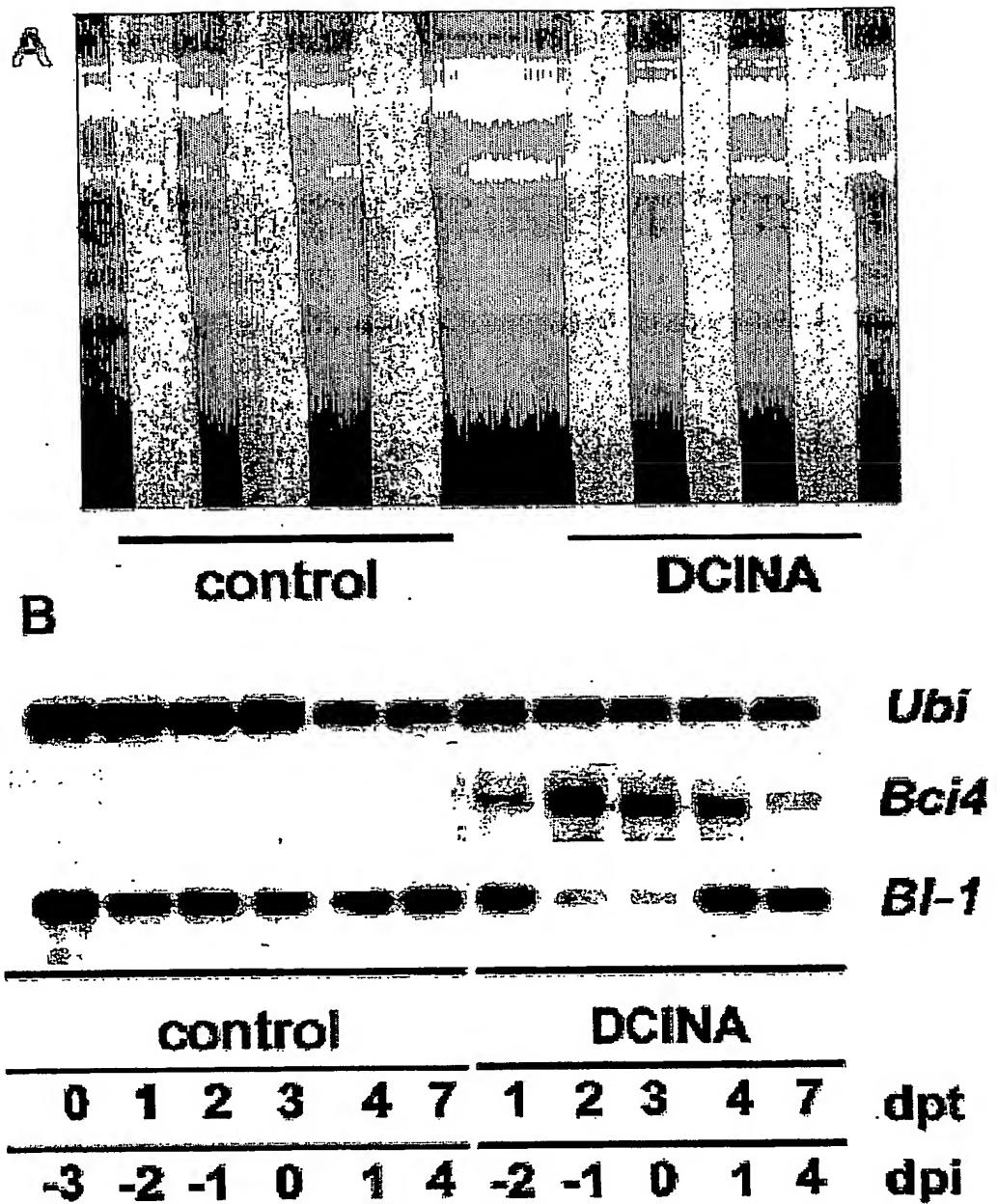


Fig. 9

12/15

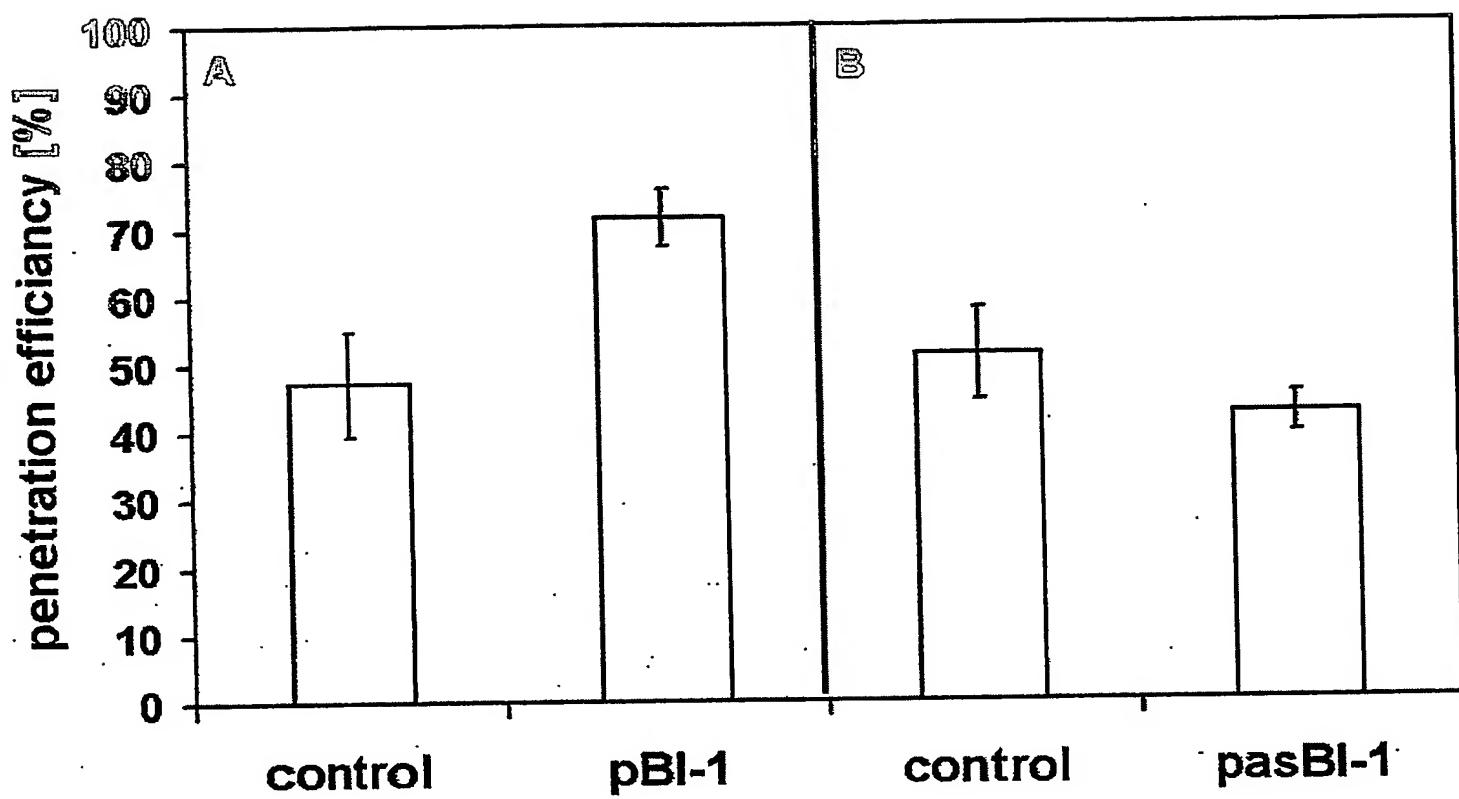


Fig.10

BEST AVAILABLE COPY

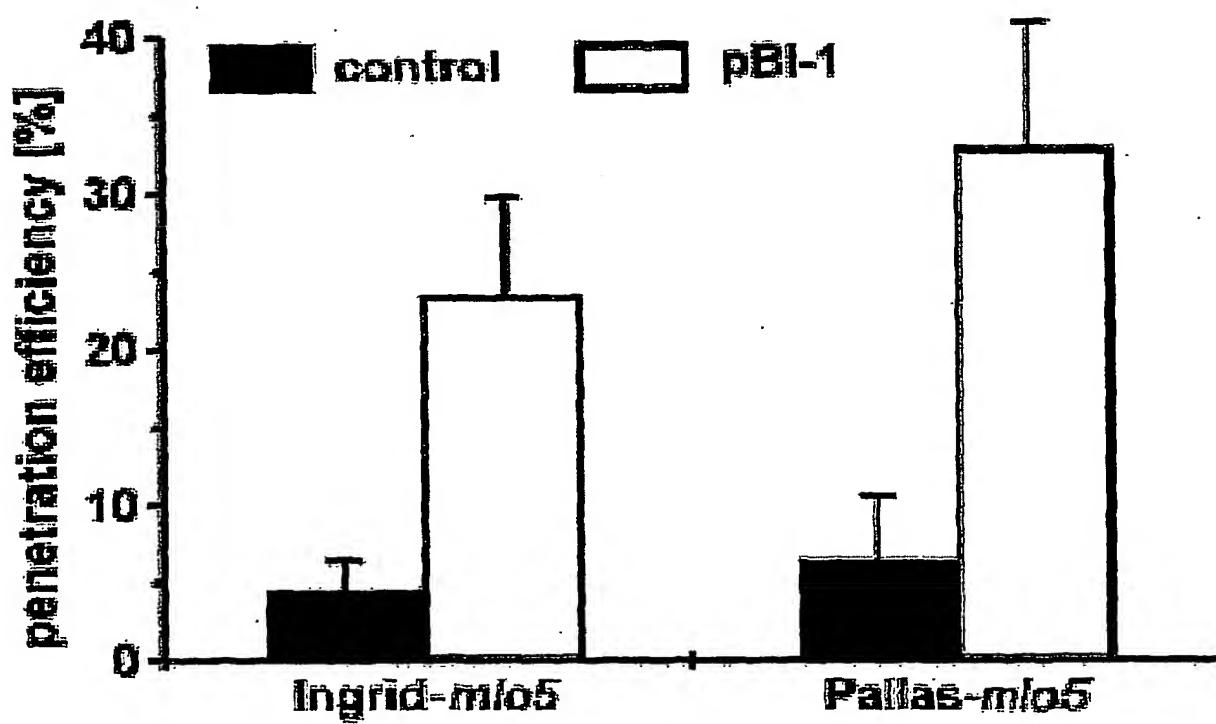


Fig.11

BEST AVAILABLE COPY

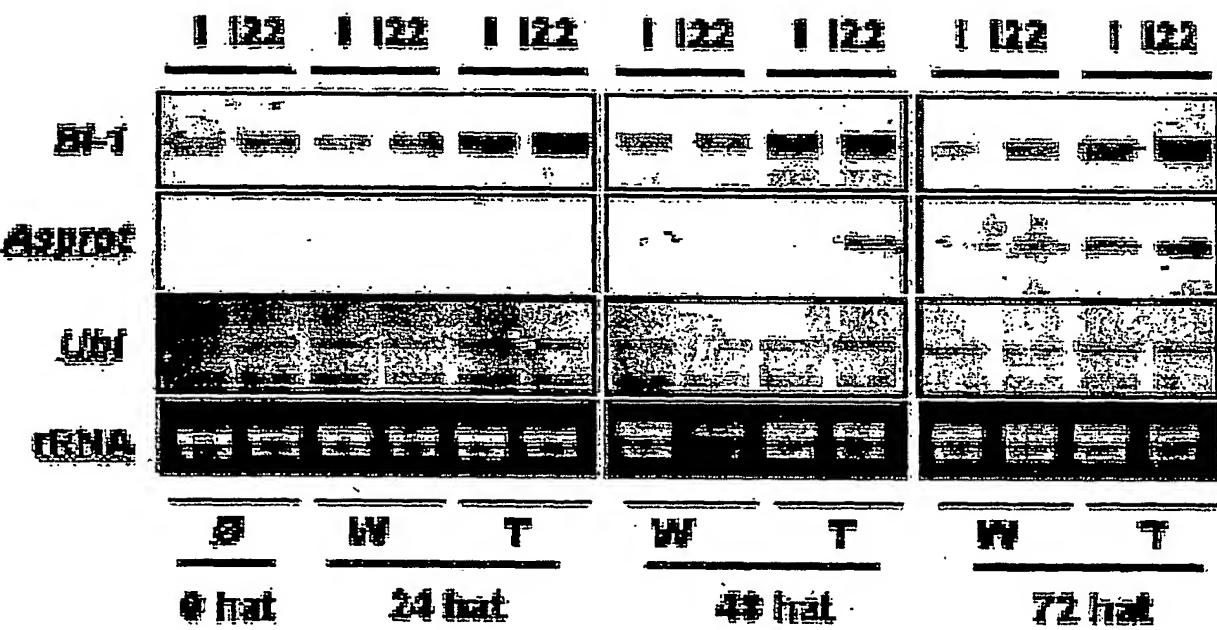
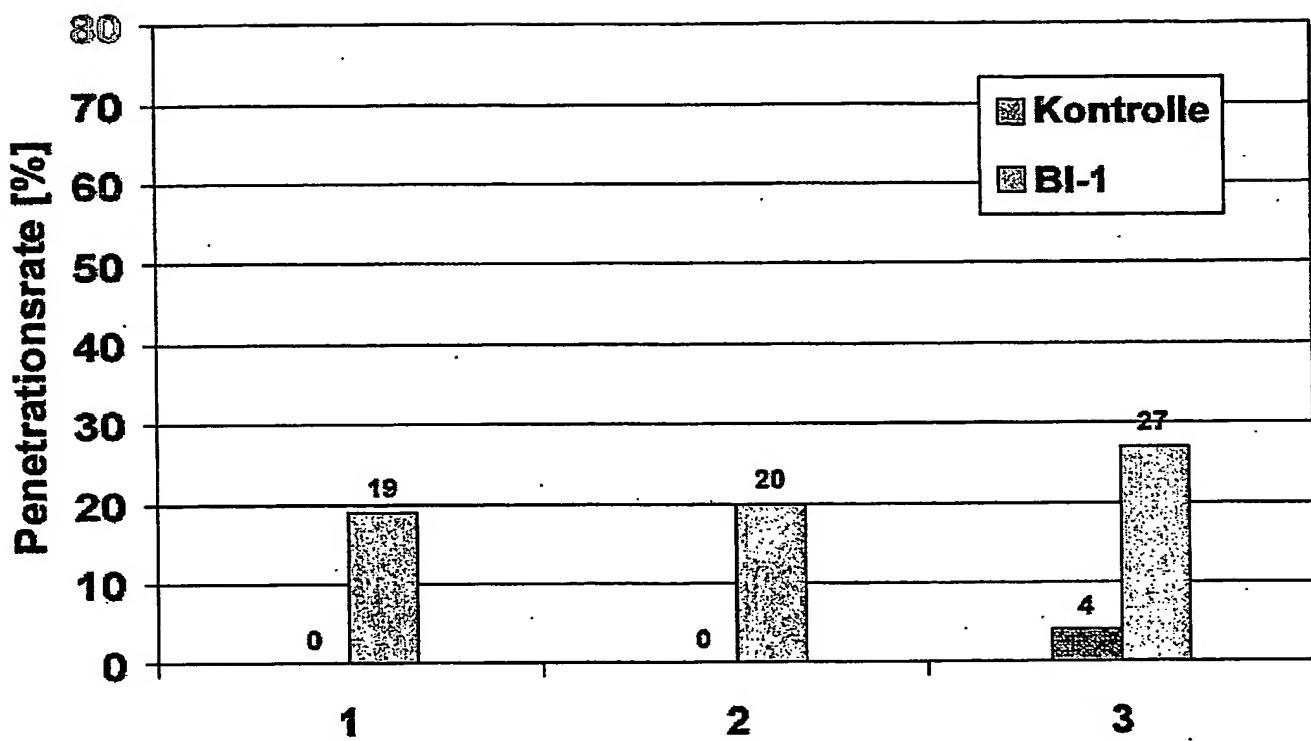


Fig.12

BEST AVAILABLE COPY**Fig.13**

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Plant Science GmbH
 5 <120> Verfahren zur Erhöhung der Resistenz gegen
 Streßfaktoren in Pflanzen
<130> PF54350-AT
 10 <140>
<141>
<160> 44
 15 <170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 744
<212> DNA
 20 <213> Hordeum vulgare
<220>
<221> CDS
<222> (1)...(741)
 25 <223> coding for B11-protein
<400> 1
atg gac gcc ttc tac tcg acc tcg tcg gcg gcg agc ggc tgg ggc 48
Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ser Gly Trp Gly
 1 5 10 15
 30 cac gac tcc ctc aag aac ttc cgc cag atc tcc ccc gcc gtg cag tcc 96
His Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala Val Gln Ser
 20 25 30
 35 cac ctc aag ctc gtt tac ctg act cta tgc ttt gca ctg gcc tca tct 144
His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Phe Ala Leu Ala Ser Ser
 35 40 45
 40 gcc gtt gct tac cta cac att gcc ctg aac atc ggc ggg atg ctg 192
Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu
 50 55 60
 45 aca atg ctc gct tgt gtc gga act atc gcc tgg atg ttc tcc gtg cca 240
Thr Met Leu Ala Cys Val Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro
 65 70 75 80
 50 gtc tat gag gag agg aag agg ttt ggg ctg ctg atg ggt gca gcc ctc 288
Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu
 85 90 95
 55 ctg gaa ggg gct tcg gtt gga cct ctg att gag ctt gcc ata gac ttt 336
Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe
 100 105 110
 60 gac cca agc atc ctc gtg aca ggg ttt gtc gga acc gcc atc gcc ttt 384
Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe
 115 120 125
 65 ggg tgc ttc tct ggc gcc gcc atc atc gcc aag cgc agg gag tac ctg 432
Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu
 130 135 140
 70 tac ctc ggt ggc ctg ctc tcg tct ggc ctg atc ctg ctc tgg ctg 480
Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu
 145 150 155 160
 70 cag ttt gtc acg tcc atc ttt ggc cac tcc tct ggc agc ttc atg ttt 528
Gln Phe Val Thr Ser Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe
 165 170 175
 70 gag gtt tac ttt ggc ctg ttg atc ttc ctg ggg tac atg gtg tac gac 576
Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp

	180	185	190	
				624
5	acg cag gag atc atc gag agg gcg cac cat ggc gac atg gac tac atc Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile 195 200 205			
				672
10	aag cac gcc ctc acc ctc ttc acc gac ttt gtt gcc gtc ctc gtc cga Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg 210 215 220			
				720
	gtc ctc atc atc atg ctc aag aac gca ggc gac aag tcg gag gac aag Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys 225 230 235 240			
15	aag aag agg aag agg ggg tcc tga Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser 245			744
20	<210> 2 <211> 247 <212> PRT <213> Hordeum vulgare			
25	<400> 2 Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ser Gly Trp Gly 1 5 10 15			
30	His Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala Val Gln Ser 20 25 30			
	His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Phe Ala Leu Ala Ser Ser 35 40 45			
35	Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu 50 55 60			
	Thr Met Leu Ala Cys Val Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro 65 70 75 80			
40	Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu 85 90 95			
	Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe 100 105 110			
45	Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe 115 120 125			
	Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu 130 135 140			
	Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu 145 150 155 160			
55	Gln Phe Val Thr Ser Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe 165 170 175			
	Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp 180 185 190			
60	Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile 195 200 205			
	Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg 210 215 220			
	Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys 225 230 235 240			
70	Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser 245			

5 <210> 3
 <211> 1067
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana
 10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(741)
 <223> coding for BII-protein
 15 <400> 3
 atg gat gcg ttc tct tcc ttc gat tct caa cct ggt agc aga agc 48
 Met Asp Ala Phe Ser Ser Phe Phe Asp Ser Gln Pro Gly Ser Arg Ser
 1 5 10 15
 20 tgg agc tat gat tct ctt aaa aac ttc cgt cag att tct cca gcc gtt 96
 Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala Val
 25 20 25 30
 25 cag aat cat ctt aaa cgg gtt tat ttg acc tta tgt tgt gct ctt gtg 144
 Gln Asn His Leu Lys Arg Val Tyr Leu Thr Leu Cys Cys Ala Leu Val
 35 35 40 45
 30 gcg tct gcc ttt gga gct tac ctc cat gtg ctc tgg aat atc ggc ggt 192
 Ala Ser Ala Phe Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly
 50 55 60
 35 att ctt aca acg att gga tgt att gga act atg att tgg ctc ctt tca 240
 Ile Leu Thr Thr Ile Gly Cys Ile Gly Thr Met Ile Trp Leu Leu Ser
 65 70 75 80
 40 tgt cct cct tat gaa cac caa aaa agg ctt tct ctt ctg ttt gtg tct 288
 Cys Pro Pro Tyr Glu His Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Phe Val Ser
 85 90 95
 45 gct gtt ctt gaa ggt gct tct gtt ggc ccc ttg atc aaa gtg gca att 336
 Ala Val Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Val Ala Ile
 100 105 110
 50 gat gtt gac cca agc atc ctt atc act gca ttt gtt gga act ggc ata 384
 Asp Val Asp Pro Ser Ile Leu Ile Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile
 115 120 125
 55 gcg ttt gtc tgt ttc tca gca gca gca atg tta gca aga cgc agg gag 432
 Ala Phe Val Cys Phe Ser Ala Ala Ala Met Leu Ala Arg Arg Arg Glu
 130 135 140
 60 tat ctc tac ctt gga gga ctg ctt tca tct ggc ttg tct atg cta atg 480
 Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Met Leu Met
 145 150 155 160
 65 tgg ctc cag ttt gcc tct tca atc ttt ggt ggc tct gca tct atc ttt 528
 Trp Leu Gln Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Ala Ser Ile Phe
 165 170 175
 70 aag ttt gag ttg tac ttt gga ctt ttg atc ttt gtg gga tac atg gtg 576
 Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Val Gly Tyr Met Val
 180 185 190
 75 gtc gac aca caa gag att ata gaa aag gca cac ctc ggt gac atg gac 624
 Val Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp Met Asp
 195 200 205
 80 tat gta aaa cat tcg ttg acc ctt ttc act gac ttt gta gct gtg ttt 672
 Tyr Val Lys His Ser Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Phe
 210 215 220
 85 gtt cgg att ctc atc ata atg ttg aag aac tca gca gat aaa gaa gag 720
 Val Arg Ile Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ala Asp Lys Glu Glu
 225 230 235 240

aag aag aag aaa agg aga aac tgagggatg taaagttaat ttaactttat 771
 Lys Lys Lys Arg Arg Asn
 245

5 gggtgttatac gtgtgtggcc actttgaaga tattacttgt tagcactctc tattggtgac 831
 cagacatgtt tccactaaaa aggatctgct tggttcaactt ctgcacaagt accatcttc 891
 10 gattgttaat gactcgagtg ttgttcttct tttcataaac ttttggtctt taagagttt 951
 gttctactga ttgcatactta ccaagctaag aataatgttag gaaaatgata atcctgttta 1011
 aattttctaa aatgtgtgca tttcagaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1067

15 <210> 4
 <211> 247
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana
 20 <400> 4
 Met Asp Ala Phe Ser Ser Phe Phe Asp Ser Gln Pro Gly Ser Arg Ser
 1 5 10 15

25 Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala Val
 20 25 30

Gln Asn His Leu Lys Arg Val Tyr Leu Thr Leu Cys Cys Ala Leu Val
 35 40 45

30 Ala Ser Ala Phe Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly
 50 55 60

Ile Leu Thr Thr Ile Gly Cys Ile Gly Thr Met Ile Trp Leu Leu Ser
 35 65 70 75 80

Cys Pro Pro Tyr Glu His Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Phe Val Ser
 85 90 95

40 Ala Val Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Val Ala Ile
 100 105 110

Asp Val Asp Pro Ser Ile Leu Ile Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile
 115 120 125

45 Ala Phe Val Cys Phe Ser Ala Ala Ala Met Leu Ala Arg Arg Arg Glu
 130 135 140

50 Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Met Leu Met
 145 150 155 160

Trp Leu Gln Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Ala Ser Ile Phe
 165 170 175

55 Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Val Gly Tyr Met Val
 180 185 190

Val Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp Met Asp
 195 200 205

60 Tyr Val Lys His Ser Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Phe
 210 215 220

65 Val Arg Ile Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ala Asp Lys Glu Glu
 225 230 235 240

Lys Lys Lys Arg Arg Asn
 245

70

<210> 5
 <211> 1160

<212> DNA
 <213> Nicotiana tabacum
 5 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(747)
 <223> coding for BII-protein

10	<400> 5 atg gag tct tgc aca tcg ttc ttc aat tca cag tcg gcg tcg tct cgc Met Glu Ser Cys Thr Ser Phe Phe Asn Ser Gln Ser Ala Ser Ser Arg 1 5 10 15	48
15	aat cgc tgg agt tac gat tct ctt aag aac ttc cgc cag atc tct ccc Asn Arg Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro 20 25 30	96
20	ttt gtt caa act cat ctc aaa aag gtc tac ctt tca tta tgt tgt gct Phe Val Gln Thr His Leu Lys Val Tyr Leu Ser Leu Cys Cys Ala 35 40 45	144
25	tta gtt gct tcg gct gga gct tac ctt cac att ctt tgg aac att Leu Val Ala Ser Ala Ala Gly Ala Tyr Leu His Ile Leu Trp Asn Ile 50 55 60	192
30	ggg ggc tta ctt acg aca ttg gga tgt gtg gga agc ata gtg tgg ctg Gly Gly Leu Leu Thr Thr Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile Val Trp Leu 65 70 75 80	240
35	atg gcg aca cct ctg tat gaa gag caa aag agg ata gca ctt ctg atg Met Ala Thr Pro Leu Tyr Glu Glu Gln Lys Arg Ile Ala Leu Leu Met 85 90 95	288
40	gca gct gca ctg ttt aaa gga gca tct att ggt cca ctg att gaa ttg Ala Ala Ala Leu Phe Lys Gly Ala Ser Ile Gly Pro Leu Ile Glu Leu 100 105 110	336
45	gct att gac ttt gac cca agc att gtg atc ggt gct ttt gtt ggt tgt Ala Ile Asp Phe Asp Pro Ser Ile Val Ile Gly Ala Phe Val Gly Cys 115 120 125	384
50	gct gtg gct ttt ggt tgc ttc tca gct gct gcc atg gtg gca agg cgc Ala Val Ala Phe Gly Cys Phe Ser Ala Ala Met Val Ala Arg Arg 130 135 140	432
55	aga gag tac ttg tat ctt gga ggt ctt ctt tca tct ggt ctc tct atc Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile 145 150 155 160	480
60	ctt ttc tgg ttg cac ttc gcg tcc tcc att ttt ggt ggt tct atg gcc Leu Phe Trp Leu His Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Met Ala 165 170 175	528
65	ttg ttc aag ttc gag gtt tat ttt ggg ctc ttg gtg ttt gtg ggc tat Leu Phe Lys Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr 180 185 190	576
70	atc att ttt gac acc caa gat ata att gag aag gca cac ctt ggg gat Ile Ile Phe Asp Thr Gln Asp Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp 195 200 205	624
75	ttg gac tac gtg aag cat gct ctg acc ctc ttt aca gat ttt gtt gct Leu Asp Tyr Val Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala 210 215 220	672
80	gtt ttt gtg cga ata tta atc ata atg ctg aag aat gca tcc gac aag Val Phe Val Arg Ile Leu Ile Met Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys 225 230 235 240	720
85	gaa gag aag aag aag agg aga aac taatgcataa gcgggttattc Glu Glu Lys Lys Lys Arg Arg Asn 245	767

aaagactctg taactctaga atctggcatt ttcttgcattca taaaacttctg tagaccttcg 827
 acaagtatgt tgttaatagt ttggtaacgc ctcagattaa gctgcgaggc tctgttatgc 887

5 cgcatgccaa tgtggttatg gtggcacata gatggtttg tttccgaagc ataccatcaa 947
 ataacatgca tggttacact atatcgataa cctacgagtg tactacttat ttctgctccc 1007
 10 ttttgctgtg ttaggttgtt catgattgta tagttgattt tccgttatgt tagaccatct 1067
 tctttcttga cggttaattt ctcatattga tgggagaaaat gaaaattcac accgtcgccc 1127
 caacttgtt aagactgagg cgcaattgta gtt 1160

15 <210> 6
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Nicotiana tabacum

20 <400> 6
 Met Glu Ser Cys Thr Ser Phe Phe Asn Ser Gln Ser Ala Ser Ser Arg
 1 5 10 15

25 Asn Arg Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro
 20 25 30

Phe Val Gln Thr His Leu Lys Lys Val Tyr Leu Ser Leu Cys Cys Ala
 35 40 45

30 Leu Val Ala Ser Ala Ala Gly Ala Tyr Leu His Ile Leu Trp Asn Ile
 50 55 60

Gly Gly Leu Leu Thr Thr Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile Val Trp Leu
 35 65 70 75 80

Met Ala Thr Pro Leu Tyr Glu Glu Gln Lys Arg Ile Ala Leu Leu Met
 85 90 95

40 Ala Ala Ala Leu Phe Lys Gly Ala Ser Ile Gly Pro Leu Ile Glu Leu
 100 105 110

Ala Ile Asp Phe Asp Pro Ser Ile Val Ile Gly Ala Phe Val Gly Cys
 115 120 125

45 Ala Val Ala Phe Gly Cys Phe Ser Ala Ala Ala Met Val Ala Arg Arg
 130 135 140

50 Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile
 145 150 155 160

Leu Phe Trp Leu His Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Met Ala
 165 170 175

55 Leu Phe Lys Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr
 180 185 190

Ile Ile Phe Asp Thr Gln Asp Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp
 195 200 205

60 Leu Asp Tyr Val Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala
 210 215 220

65 Val Phe Val Arg Ile Leu Ile Met Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys
 225 230 235 240

Glu Glu Lys Lys Lys Lys Arg Arg Asn
 245

<212> DNA
 <213> Oryza sativa

5 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(747)
 <223> coding for BI1-protein

10 <400> 7
 atg gac gcc ttc tac tcg acc tcg tcg gcg tac gga gcg gcg gcg agc 48
 Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Tyr Gly Ala Ala Ala Ser
 1 5 10 15

15 ggc tgg ggc tac gac tcg ctg aag aac ttc cgc cag atc tcc ccc gcc 96
 Gly Trp Gly Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala
 20 25 30

20 gtc cag tcc cac ctc aag ctc gtt tac ctg aca cta tgc gtc gcc ctg 144
 Val Gln Ser His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Val Ala Leu
 35 40 45

25 gct gcg tcg gcg gtg ggc gca tac ctg cac gtc gcc ttg aac atc ggc 192
 Ala Ala Ser Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Val Ala Leu Asn Ile Gly
 50 55 60

30 ggg atg ttg act atg ctc ggg tgc gtg ggg agc atc gcc ttg ttg ttc 240
 Gly Met Leu Thr Met Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile Ala Trp Leu Phe
 65 70 75 80

35 tcg gtg cct gtc ttt gag gag agg aag agg ttt ggg att ctc ttg gcc 288
 Ser Val Pro Val Phe Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Ile Leu Leu Ala
 85 90 95

40 gct gcc ctg ctg gaa ggg gct tca gtt ggg cct ctg atc aag ctt gct 336
 Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Leu Ala
 100 105 110

45 gta gac ttt gac tca agc att ctc gta aca gca ttt gtt gga act gcc 384
 Val Asp Phe Asp Ser Ser Ile Leu Val Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala
 115 120 125

50 att gca ttt ggg tgc ttc act tgc gct gcc atc gtt gcc aag cgt agg 432
 Ile Ala Phe Gly Cys Phe Thr Cys Ala Ala Ile Val Ala Lys Arg Arg
 130 135 140

55 gag tac ctc tac ctt ggt ggt ttg ctc tct tct ggc ctc tcc atc ctg 480
 Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu
 145 150 155 160

60 ctc tgg ctg cag ttt gcc gca tcc atc ttt ggc cac tcc acc ggc agc 528
 Leu Trp Leu Gln Phe Ala Ala Ser Ile Phe Gly His Ser Thr Gly Ser
 165 170 175

65 ttc atg ttt gag gtt tac ttt ggc ctc ttg atc ttc ctg ggg tac atg 576
 Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met
 180 185 190

70 gtg tat gac acg cag gag atc atc gag agg gct cac cac ggt gac atg 624
 Val Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met
 195 200 205

75 gac tac atc aag cac gca ctc acc ctc ttc act gac ttc gtg gcc gtc 672
 Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val
 210 215 220

80 ctt gtc cgg atc ctc gtc atc atg ctc aag aac gcg tct gac aag tcg 720
 Leu Val Arg Ile Leu Val Ile Met Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys Ser
 225 230 235 240

85 gag gag aag aag agg aag aag agg tct tgagagcttc tcttccccgtc 767
 Glu Glu Lys Lys Arg Lys Lys Arg Ser
 245

ttgcacataa gaaaaaacca ccgcggctat tgcccttacg tattatgaca gagccgcact 827
 tcaactgggt tttatggta atacaagttc ttttcattt tgttgatacg gtgtaatct 887

5 tctcagggtt gtcgtcgtag tagcttgca aatactagca tgctacatga cacggatctt 947
 tctgtaatgg tggtcgcggt gatcgaaacg tgaaaacaca tcttcattt cgactaattt 1007
 gtttgcctt tggtgattga tgatgatcct ttccccaaaa aaaaaaaaaa 1056

10

<210> 8
 <211> 249
 <212> PRT

15 <213> Oryza sativa

<400> 8
 Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Tyr Gly Ala Ala Ala Ser
 1 5 10 15

20 Gly Trp Gly Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala
 20 25 30

25 Val Gln Ser His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Val Ala Leu
 35 40 45

Ala Ala Ser Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Val Ala Leu Asn Ile Gly
 50 55 60

30 Gly Met Leu Thr Met Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile Ala Trp Leu Phe
 65 70 75 80

Ser Val Pro Val Phe Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Ile Leu Leu Ala
 85 90 95

35 Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Leu Ala
 100 105 110

Val Asp Phe Asp Ser Ser Ile Leu Val Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala
 115 120 125

Ile Ala Phe Gly Cys Phe Thr Cys Ala Ala Ile Val Ala Lys Arg Arg
 130 135 140

45 Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu
 145 150 155 160

Leu Trp Leu Gln Phe Ala Ala Ser Ile Phe Gly His Ser Thr Gly Ser
 165 170 175

50 Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met
 180 185 190

55 Val Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met
 195 200 205

Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val
 210 215 220

60 Leu Val Arg Ile Leu Val Ile Met Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys Ser
 225 230 235 240

Glu Glu Lys Lys Arg Lys Lys Arg Ser
 245

65

<210> 9
 <211> 973

70 <212> DNA
 <213> Brassica napus

<220>

<221> CDS
<222> (1)...(741)
<223> coding for BII-protein

5	<400> 9 atg gat tca ttc tcg tcc ttc gat tct caa cct ggt agc aga agc Met Asp Ser Phe Ser Ser Phe Phe Asp Ser Gln Pro Gly Ser Arg Ser 1 5 10 15	48
10	tgg agc tat gat tct ctc aaa aac ctc cgt cag att tct ccc tcc gtc Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Leu Arg Gln Ile Ser Pro Ser Val 20 25 30	96
15	cag aat cat ctc aag agg gtt tat ctc act ctg tgt tgt gct ctc gtt Gln Asn His Leu Lys Arg Val Tyr Leu Thr Leu Cys Cys Ala Leu Val 35 40 45	144
20	gcg tct gcg ttt gga gct tac ctc cac gtg ctc tgg aac ata ggt ggt Ala Ser Ala Phe Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly 50 55 60	192
	att ctc act acc att gga tgc ttt gga agc atg att tgg ctg ctc tcc Ile Leu Thr Thr Ile Gly Cys Phe Gly Ser Met Ile Trp Leu Leu Ser 65 70 75 80	240
25	tgt cct cct tat gaa caa caa aag agg ctt tcc ctt ctg ttt ctg tct Cys Pro Pro Tyr Glu Gln Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Phe Leu Ser 85 90 95	288
30	gct gtt ctc gaa ggt gct tca gtt ggt ccc ttg atc aaa gtg gca gtt Ala Val Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Val Ala Val 100 105 110	336
35	gat ttt gac cca agc atc ctc atc act gcg ttt gtc gga act gcg ata Asp Phe Asp Pro Ser Ile Leu Ile Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile 115 120 125	384
40	gcc ttt atc tgt ttc tca ggg gca gcg atg ttg gca aga cgc aga gag Ala Phe Ile Cys Phe Ser Gly Ala Ala Met Leu Ala Arg Arg Arg Glu 130 135 140	432
	tac ctc tac ctc gga gga ctg ctt tca tct ggc ttg tcc atg ctt atg Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Met Leu Met 145 150 155 160	480
45	tgg ctt cag ttt gcc tct tcc atc ttt ggt ggc tct gca tcc atc ttt Trp Leu Gln Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Ala Ser Ile Phe 165 170 175	528
50	aag ttt gag ctc tac ttt gga ctc ttg atc ttt gtg gga tac atg gtg Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Ile Phe Val Gly Tyr Met Val 180 185 190	576
55	gtg gac actcaa gat attata gag aag gcc cac ctc ggt gac atg gat Val Asp Thr Gln Asp Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp Met Asp 195 200 205	624
60	tac gtg aaa cat tcg ttg acc ctt ttc acc gat ttt gta gct gtg ttt Tyr Val Lys His Ser Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Phe 210 215 220	672
	gtt cgt gtt ctc atc att atg ctg aag aac tcg gca gat aaa gaa gat Val Arg Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ala Asp Lys Glu Asp 225 230 235 240	720
65	aaa aag aag agg agg agg aac tgagactaaa aagtgagaaa gaaagctaaa Lys Lys Lys Arg Arg Arg Asn 245	771
70	tagagtgggt gttatgtgtg tttcaaaaaaa taaaaaagag tgggtgttat aagtacagac atgatagcgt tgggttttt tacttggttgaacagttt ggtaacaaca cacgttacgt	831 891

10

atttgtgtat tcctcttagt gactccagat tgtgaatgga tcagtatctt gaaaactgtgt 951
 taaaaattat cagttggag ct 973

5

<210> 10
 <211> 247
 <212> PRT
 <213> Brassica napus

10

<400> 10
 Met Asp Ser Phe Ser Ser Phe Phe Asp Ser Gln Pro Gly Ser Arg Ser
 1 5 10 15

15

Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Leu Arg Gln Ile Ser Pro Ser Val
 20 25 30

Gln Asn His Leu Lys Arg Val Tyr Leu Thr Leu Cys Cys Ala Leu Val
 35 40 45

20

Ala Ser Ala Phe Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly
 50 55 60

25

Ile Leu Thr Thr Ile Gly Cys Phe Gly Ser Met Ile Trp Leu Leu Ser
 65 70 75 80

Cys Pro Pro Tyr Glu Gln Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Phe Leu Ser
 85 90 95

30

Ala Val Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Val Ala Val
 100 105 110

Asp Phe Asp Pro Ser Ile Leu Ile Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile
 115 120 125

35

Ala Phe Ile Cys Phe Ser Gly Ala Ala Met Leu Ala Arg Arg Arg Glu
 130 135 140

40

Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Met Leu Met
 145 150 155 160

Trp Leu Gln Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Ala Ser Ile Phe
 165 170 175

45

Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Val Gly Tyr Met Val
 180 185 190

Val Asp Thr Gln Asp Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp Met Asp
 195 200 205

50

Tyr Val Lys His Ser Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Phe
 210 215 220

55

Val Arg Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ala Asp Lys Glu Asp
 225 230 235 240

Lys Lys Lys Arg Arg Asn
 245

60

<210> 11
 <211> 747

<212> DNA

<213> Glycine max

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(744)

<223> coding for BII-protein

<400> 11

cga ttg caa gca atg gac gcc ttc aat tcc ttc gat tca aga aac 48

11

Arg Leu Gln Ala Met Asp Ala Phe Asn Ser Phe Phe Asp Ser Arg Asn 1 5 10 15	
cga tgg aat tac gat act ctc aaa aac ttc cgt cag att tct ccg gtc 5 Arg Trp Asn Tyr Asp Thr Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Val 20 25 30 96	
gtg cag aat cac ctg aag cag gtt tat ttt act ctg tgc ttt gcc gtg 10 Val Gln Asn His Leu Lys Gln Val Tyr Phe Thr Leu Cys Phe Ala Val 35 40 45 144	
gtt gct gcg gct gtc ggg gct tac ctt cat gtc ctc ttg aac att ggg Val Ala Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Leu Asn Ile Gly 50 55 60 192	
ggt ttt ctt act aca gta gca tgc atg gga agc agc ttt tgg tta ctc Gly Phe Leu Thr Thr Val Ala Cys Met Gly Ser Ser Phe Trp Leu Leu 65 70 75 80 240	
tcc aca cct cct ttt gaa gag agg aag agg gta act ttg ttg atg gcc Ser Thr Pro Pro Phe Glu Glu Arg Lys Arg Val Thr Leu Leu Met Ala 85 90 95 288	
gca tca ctg ttt cag ggt tcc tct att gga ccc ttg att gat ttg gct Ala Ser Leu Phe Gln Gly Ser Ser Ile Gly Pro Leu Ile Asp Leu Ala 100 105 110 336	
att cat atc gat cca agc ctt atc ttt agt gca ttt gta gga aca gcc Ile His Ile Asp Pro Ser Leu Ile Phe Ser Ala Phe Val Gly Thr Ala 115 120 125 384	
ttg gcc ttt gca tgc ttc tca gga gca gct ttg gtt gct agg cgt agg Leu Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Leu Val Ala Arg Arg Arg 130 135 140 432	
gag tac ctg tac ctt ggt ggc ttg gtt tct tct gga ttg tcc atc ctt Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Val Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu 145 150 155 160 480	
ctc tgg ttg cac ttt gct tct tcc atc ttt gga ggc tca aca gct ctc Leu Trp Leu His Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Thr Ala Leu 165 170 175 528	
ttt aag ttt gag ttg tac ttt ggg ctt ttg gta ggt tac att 45 Phe Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr Ile 180 185 190 576	
gta gta gac acc caa gaa ata gtt gag agg gca cac ttg ggc gat ctg Val Val Asp Thr Gln Glu Ile Val Glu Arg Ala His Leu Gly Asp Leu 195 200 205 624	
gac tat gta aag cat gcc ttg acc ttg ttt acc gat ttg gtc gca gtt Asp Tyr Val Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Leu Val Ala Val 210 215 220 672	
ttt gtc cgg att ctt gtt att atg ttg aag aat tcg act gag agg aat Phe Val Arg Ile Leu Val Ile Met Leu Lys Asn Ser Thr Glu Arg Asn 225 230 235 240 720	
gag aag aaa aag aag aga aga gat tga 60 Glu Lys Lys Lys Arg Arg Asp 245 747	
65 <210> 12 <211> 248 <212> PRT <213> Glycine max	
70 <400> 12 Arg Leu Gln Ala Met Asp Ala Phe Asn Ser Phe Phe Asp Ser Arg Asn 1 5 10 15	

12

Arg Trp Asn Tyr Asp Thr Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Val
 20 25 30
 Val Gln Asn His Leu Lys Gln Val Tyr Phe Thr Leu Cys Phe Ala Val
 5 35 40 45
 Val Ala Ala Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Leu Asn Ile Gly
 50 55 60
 10 Gly Phe Leu Thr Thr Val Ala Cys Met Gly Ser Ser Phe Trp Leu Leu
 65 70 75 80
 Ser Thr Pro Pro Phe Glu Glu Arg Lys Arg Val Thr Leu Leu Met Ala
 85 90 95
 15 Ala Ser Leu Phe Gln Gly Ser Ser Ile Gly Pro Leu Ile Asp Leu Ala
 100 105 110
 Ile His Ile Asp Pro Ser Leu Ile Phe Ser Ala Phe Val Gly Thr Ala
 20 115 120 125
 Leu Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Leu Val Ala Arg Arg Arg
 130 135 140
 25 Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Val Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu
 145 150 155 160
 Leu Trp Leu His Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Thr Ala Leu
 165 170 175
 30 Phe Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr Ile
 180 185 190
 Val Val Asp Thr Gln Glu Ile Val Glu Arg Ala His Leu Gly Asp Leu
 35 195 200 205
 Asp Tyr Val Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Leu Val Ala Val
 210 215 220
 40 Phe Val Arg Ile Leu Val Ile Met Leu Lys Asn Ser Thr Glu Arg Asn
 225 230 235 240
 Glu Lys Lys Lys Arg Arg Asp
 245
 45

<210> 13
 <211> 1510
 50 <212> DNA
 <213> Glycine max

<220>
 <221> CDS
 55 <222> (1)...(777)
 <223> coding for BI-1 protein

<400> 13
 atc acg aaa act ata cga ttc gat tcc ttg ttt tcg atg gac act ttc
 60 Ile Thr Lys Thr Ile Arg Phe Asp Ser Leu Phe Ser Met Asp Thr Phe
 1 5 10 15
 ttc aag tcc cca tct tct tct tcg aga agc cgcc tgg agt tac gat
 65 Phe Lys Ser Pro Ser Ser Ser Arg Ser Arg Trp Ser Tyr Asp
 20 25 30
 act ctc aag aat ttc cgc gag atc tct ccg ctc gtt cag aat cac atc
 Thr Leu Lys Asn Phe Arg Glu Ile Ser Pro Leu Val Gln Asn His Ile
 35 40 45
 70 aaa ctg gtt tat ttt acg tta tgt tgc gct gtg gtc gct gct gtt
 Lys Leu Val Tyr Phe Thr Leu Cys Cys Ala Val Val Ala Ala Val
 50 55 60

	gga gct ttc ctt cat gtt ctg tgg aac att ggc ggt ttt ctc acc acg Gly Ala Phe Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly Phe Leu Thr Thr 65 70 75 80	240
5	ttg gct tcc att ggg agc atg ttt tgg ttg cta tct aca ccc cct ttt Leu Ala Ser Ile Gly Ser Met Phe Trp Leu Leu Ser Thr Pro Pro Phe 85 90 95	288
10	gaa gag caa aag agg ttg tct ctg ttg atg gct tcg gcc ctg ttt cag Glu Glu Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Met Ala Ser Ala Leu Phe Gln 100 105 110	336
15	ggt gct tcc att gga cct ctg att gat ttg gct ttt gcc att gat cct Gly Ala Ser Ile Gly Pro Leu Ile Asp Leu Ala Phe Ala Ile Asp Pro 115 120 125	384
20	ggc ctt atc att ggc gca ttt gtg gca act tct ttg gct ttt gct tgc Gly Leu Ile Ile Gly Ala Phe Val Ala Thr Ser Leu Ala Phe Ala Cys 130 135 140	432
25	ttt tct gca gta gcc tta gtt gca agg cga agg gag tac ctc tac ctt Phe Ser Ala Val Ala Leu Val Ala Arg Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu 145 150 155 160	480
30	ggt ggt ttg ctt tct tgg ctt tcc att ctt atg tgg ttg cac tct Gly Gly Leu Leu Ser Ser Trp Leu Ser Ile Leu Met Trp Leu His Ser 165 170 175	528
35	gat tcc tct ctc ttt ggg ggc tca att gca ctc ttc aag ttt gag ctg Asp Ser Ser Leu Phe Gly Gly Ser Ile Ala Leu Phe Lys Phe Glu Leu 180 185 190	576
40	tac ttt ggg ctt ttg gtg ttt gtg ggc tac gtt ata gta gac act caa Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr Val Ile Val Asp Thr Gln 195 200 205	624
45	gaa att att gaa agg gct cac ttt ggt gac ctg gat tat gtg aag cat Glu Ile Ile Glu Arg Ala His Phe Gly Asp Leu Asp Tyr Val Lys His 210 215 220	672
50	gca ttg aca ttg ttc act gat ttg gct gca atc ttt gtg cga att ctt Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Leu Ala Ala Ile Phe Val Arg Ile Leu 225 230 235 240	720
55	att ata atg ttg aag aat tca tct gag aga aat gag aag aag aag aaa Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ser Glu Arg Asn Glu Lys Lys Lys Lys 245 250 255	768
60	agg aga gat tagtaggctg accgaccgac tcgagctcag gcttctctac Arg Arg Asp	817
	agtaattttag ttgtggaga atacataatt agctgtttag atgatgttg tcccttgtgt 877	
65	agtttagttag ctatgtgttt gctgtaatgg taaatgtcag gatttctttt aaacatcttc 937 atatgtatTTT gccaatatca taatgtgtcg tataacatca taccttggtt taaaaaaaaa 997 aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaann nnnnnnnnnnn 1057 nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnng tgtttgtgg ctacgtata 1117 gtagacactc aagtaatcat tgagaggct cactttggtg acctggatta tgtaagcat 1177	
70	gcattgacac tgttcactga tttggctgca atctttgtgc gaattcttaa tataatgttg 1237 aataattcat ctaagagaaa tgagaagaag aggaggagag attaataggt tgaccgattg 1297 ctatgtgttag agtaatttg ggtagtagaga atacataatt agctgtttag aagttgttg 1357 tcccccttgtg tagtttagtag tttagctatgt gtttgctgta atggtaaatg tcaggatttc 1417 ttttaaacat tttcatatgt atttgctaatt aatcataata tatagtataa acatcattcc 1477	

ttggtttaaa aaaagaaaaa aaaaaaaaaaaa aaa 1510

5 <210> 14
<211> 259
<212> PRT
<213> Glycine max

10 <400> 14
Ile Thr Lys Thr Ile Arg Phe Asp Ser Leu Phe Ser Met Asp Thr Phe
1 5 10 15

15 Phe Lys Ser Pro Ser Ser Ser Ser Arg Ser Arg Trp Ser Tyr Asp
20 25 30

Thr Leu Lys Asn Phe Arg Glu Ile Ser Pro Leu Val Gln Asn His Ile
35 40 45

20 Lys Leu Val Tyr Phe Thr Leu Cys Cys Ala Val Val Ala Ala Ala Val
50 55 60

Gly Ala Phe Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly Phe Leu Thr Thr
65 70 75 80

25 Leu Ala Ser Ile Gly Ser Met Phe Trp Leu Leu Ser Thr Pro Pro Phe
85 90 95

30 Glu Glu Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Met Ala Ser Ala Leu Phe Gln
100 105 110

Gly Ala Ser Ile Gly Pro Leu Ile Asp Leu Ala Phe Ala Ile Asp Pro
115 120 125

35 Gly Leu Ile Ile Gly Ala Phe Val Ala Thr Ser Leu Ala Phe Ala Cys
130 135 140

Phe Ser Ala Val Ala Leu Val Ala Arg Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu
145 150 155 160

40 Gly Gly Leu Leu Ser Ser Trp Leu Ser Ile Leu Met Trp Leu His Ser
165 170 175

45 Asp Ser Ser Leu Phe Gly Gly Ser Ile Ala Leu Phe Lys Phe Glu Leu
180 185 190

Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr Val Ile Val Asp Thr Gln
195 200 205

50 Glu Ile Ile Glu Arg Ala His Phe Gly Asp Leu Asp Tyr Val Lys His
210 215 220

Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Leu Ala Ala Ile Phe Val Arg Ile Leu
225 230 235 240

55 Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ser Glu Arg Asn Glu Lys Lys Lys Lys
245 250 255

60 Arg Arg Asp

65 <210> 15
<211> 651
<212> DNA
<213> Triticum aestivum

70 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(651)
<223> coding for BI-1 protein

<400> 15
 gtc gca atg ccg ggt cga cga ttt cgt ctg acc tat gct ttg cct ggc 48
 Val Ala Met Pro Gly Arg Arg Phe Arg Leu Thr Tyr Ala Leu Pro Gly
 1 5 10 15

5 ctc atc tgc cgt ggg tgc tta cct gca cat tgc cct gaa cat tgg cgg 96
 Leu Ile Cys Arg Gly Cys Leu Pro Ala His Cys Pro Glu His Trp Arg
 20 25 30

10 gat gct gac aat gct cgc gtg tat cgg aac cat cgc ctg gat gtt ctc 144
 Asp Ala Asp Asn Ala Arg Val Tyr Arg Asn His Arg Leu Asp Val Leu
 35 40 45

15 ggt gcc agt cta cga gga gag gaa gag gtt tgg gct gct gat ggg tgc 192
 Gly Ala Ser Leu Arg Gly Glu Glu Val Trp Ala Ala Asp Gly Cys
 50 55 60

20 agc ctc ctg gaa ggg gct tca gtt gga cct ctg att gag ctt gcc ata 240
 Ser Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile
 65 70 75 80

25 gac ttt gac cca agt atc ctc gtg aca ggg ttt gtc gga acc gcc atc 288
 Asp Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile
 85 90 95

30 tac ctg tac ctc ggt ggt ctg ctc tcc tcc ggc ctg tcg atc ctg ctc 384
 Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu
 115 120 125

35 tgg ctg cag ttt gcc acg tcc atc ttt ggc cac tcc tct ggc agc ttc 432
 Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe
 130 135 140

40 atg ttt gag gtt tac ttt ggc ctg ttg atc ttc ctg gga tac atg gtg 480
 Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val
 145 150 155 160

45 tac gac acg cag gag atc atc gag agg ggc cac cac ggc gac atg gat 528
 Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp
 165 170 175

50 tac atc aag cac gcg ctc acc ctc ttc acc gac ttc gtc gcc gtt ctc 576
 Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu
 180 185 190

55 ggc caa gaa gag gag gaa gag aag tcc 651
 Gly Gln Glu Glu Glu Glu Lys Ser
 210 215

60 <210> 16
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

65 <400> 16
 Val Ala Met Pro Gly Arg Arg Phe Arg Leu Thr Tyr Ala Leu Pro Gly
 1 5 10 15

Leu Ile Cys Arg Gly Cys Leu Pro Ala His Cys Pro Glu His Trp Arg
 20 25 30

70 Asp Ala Asp Asn Ala Arg Val Tyr Arg Asn His Arg Leu Asp Val Leu
 35 40 45

Gly Ala Ser Leu Arg Gly Glu Glu Glu Val Trp Ala Ala Asp Gly Cys
 50 55 60

5 Ser Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile
 65 70 75 80

Asp Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile
 85 90 95

10 Ala Phe Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu
 100 105 110

Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu
 115 120 125

15 Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe
 130 135 140

20 Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val
 145 150 155 160

Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp
 165 170 175

25 Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu
 180 185 190

Val Arg Val Leu Ile Ile Leu Leu Lys Asn Ala Ala Asp Lys Val Gly
 195 200 205

30 Gly Gln Glu Glu Glu Glu Lys Ser
 210 215

35 <210> 17
 <211> 412
 <212> DNA
 <213> Zea mays

40 <220>
 <221> CDS
 <222> (3)...(410)
 <223> coding for B11-protein

45 <400> 17
 tt gtt att gac ttg gat tcg agg att ctc gtc act gcg ttc gtc ggg 47
 Val Ile Asp Leu Asp Ser Arg Ile Leu Val Thr Ala Phe Val Gly
 1 5 10 15

50 acc gca gtt gct ttt gca tgc ttc tct ggc gct gcc atc atc gcc aag 95
 Thr Ala Val Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys
 20 25 30

55 cgc agg gaa tac ctg tac ctc ggc ggt ctg ctt tca tct ggc ctc tcc 143
 Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser
 35 40 45

60 att ctt ctc tgg ctg cag ttt gct act tca atc ttt ggc cac acc agc 191
 Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Thr Ser
 50 55 60

65 gcg acc ttc atg ttt gag ctc tac ttt ggc ctc ctg gtt ttc ctg gga 239
 Ala Thr Phe Met Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Leu Gly
 65 70 75

70 tat atg gtg ttt gac acc cag gag atc atc gag agg gcg cac cgt ggg 287
 Tyr Met Val Phe Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His Arg Gly
 80 85 90 95

gac atg gac tac atc aag cac gcg ctg act ctc ttc acc gac ttt gtt 335
 Asp Met Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val
 100 105 110

gcg gtt ctt gtt cga atc ctt gtc atc atg atg aag aat gca cag gag 383
 Ala Val Leu Val Arg Ile Leu Val Ile Met Met Lys Asn Ala Gln Glu
 115 120 125
 5 aaa tcc caa gac gag aag aag agg aag aa 412
 Lys Ser Gln Asp Glu Lys Lys Arg Lys
 130 135
 10 <210> 18
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Zea mays
 15 <400> 18
 Val Ile Asp Leu Asp Ser Arg Ile Leu Val Thr Ala Phe Val Gly Thr
 1 5 10 15
 20 Ala Val Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg
 20 25 30
 Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile
 35 40 45
 25 Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Thr Ser Ala
 50 55 60
 Thr Phe Met Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Leu Gly Tyr
 30 65 70 75 80
 Met Val Phe Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His Arg Gly Asp
 85 90 95
 35 Met Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala
 100 105 110
 Val Leu Val Arg Ile Leu Val Ile Met Met Lys Asn Ala Gln Glu Lys
 115 120 125
 40 Ser Gln Asp Glu Lys Lys Arg Lys
 130 135
 45 <210> 19
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum
 50 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(342)
 55 <400> 19
 gcc gcc atc atc gcc aag cgc agg gag tac ctg tac ctc ggt ggc ctg 48
 Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu
 1 5 10 15
 60 ctc tcc tcc ggc ctg tcg atc ctg ctc tgg ctg cag ttt gcc acg tcc 96
 Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser
 20 25 30
 65 atc ttt ggc cac tcc tct ggc agc ttc atg ttt gag gtt tac ttt ggc 144
 Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly
 35 40 45
 70 ctg ttg atc ttt ctg gga tac atg gtg tac gac acg cag gag atc atc 192
 Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile
 50 55 60
 gag agg gcg cac cac ggc gac atg gac tac atc aag cac cac gcg ctc acc 240
 Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr

18

	65	70	75	80	
	ctc ttc acc gac ttt gtc gcc gtc ctc gtc cgg atc ctc atc atc atg Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg Ile Leu Ile Ile Met				288
5	85		90		95
	ctc aag aac gca ggc gac aag tcg gag gac aag aag aag agg aag agg Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys Lys Arg Lys Arg				336
	100	105		110	
10	agg tcc tga Arg Ser				345
	<210> 20 <211> 114 <212> PRT <213> Triticum aestivum				
20	<400> 20 Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Leu 1 5 10 15				
25	Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser 20 25 30				
	Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly 35 40 45				
30	Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile 50 55 60				
	Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr 65 70 75 80				
35	Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg Ile Leu Ile Ile Met 85 90 95				
40	Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys Lys Lys Arg Lys Arg 100 105 110				
	Arg Ser				
45	<210> 21 <211> 403 <212> DNA <213> Zea mays				
	<220> <221> CDS <222> (1)...(402) <223> coding for B11-protein				
50	<400> 21 ggc agc atc gcc tgg ctc ttc tcg gtg ccc gtc tac gag gag agg aag Gly Ser Ile Ala Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys 1 5 10 15				48
60	agg tac tgg ctg ctg atg gcg gct gcc ctc ctg gaa ggg gcg tcg gtt Arg Tyr Trp Leu Leu Met Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val 20 25 30				96
65	gga ccc ctc atc aag ctc gcc gtg gaa ttt gac cca agc atc ctg gtg Gly Pro Leu Ile Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val 35 40 45				144
70	aca gcg ttc gtg ggg act gcc att gcg ttc gcg tgc ttc tct tgc gcg Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Cys Ala 50 55 60				192

19

gcc atg gtg gcc aag cgc agg gag tac ctc tac ctg ggc ggg ctg ctc 240
 Ala Met Val Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu
 65 70 75 80

5 tct tct ggc ctc tcc atc ctg ctc tgg ctg cag ttc gcc gcc tcc atc 288
 Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Ala Ser Ile
 85 90 95

10 ttc ggc cac caa tcc act agc agc ttc atg ttt gag gtc tac ttt ggg 336
 Phe Gly His Gln Ser Thr Ser Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly
 100 105 110

15 ctg ctc atc ttc ctg ggc tac atg gtg tac gac acg cag gag gtc atc 384
 Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp Thr Gln Glu Val Ile
 115 120 125

20 gag agg gcg cac cac ggc g 403
 Glu Arg Ala His His Gly
 130

25 <210> 22
 <211> 134
 <212> PRT
 25 <213> Zea mays

30 <400> 22
 Gly Ser Ile Ala Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys
 1 5 10 15

35 Arg Tyr Trp Leu Leu Met Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val
 20 25 30

40 Gly Pro Leu Ile Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val
 35 40 45

45 Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Cys Ala
 50 55 60

50 Ala Met Val Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu
 65 70 75 80

55 Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Ala Ser Ile
 85 90 95

60 Phe Gly His Gln Ser Thr Ser Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly
 100 105 110

65 Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp Thr Gln Glu Val Ile
 115 120 125

70 Glu Arg Ala His His Gly
 130

55 <210> 23
 <211> 410
 <212> DNA
 60 <213> Zea mays

65 <220>
 <221> CDS
 <222> (3)...(410)
 65 <223> coding for BII-protein

70 <400> 23 47
 gc tgg aac atc ggc gtg agg ctg aca atg ctc ggt tgc atc ggc agc
 Trp Asn Ile Gly Val Arg Leu Thr Met Leu Gly Cys Ile Gly Ser
 1 5 10 15

75 atc gac tgg ctc ttc tcg gtg ccc gtc tac gag gag agg aag agg tat 95
 Ile Asp Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Tyr

	20	25	30	
5	ggg ctg ctg atg gcg gct gcc ctc ctg gaa ggc gct tcg gtc gga ccc Gly Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro 35 40 45			143
10	ctc gtc aag ctc gcc gtg gaa ttt gac cca agc atc ctg gtg acg gcg Leu Val Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Ala 50 55 60			191
15	ttc gtg ggg act gcc atc gcg ttc gcg tgc ttc tcc ggc gcg gcc atg Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Met 65 70 75			239
20	gtg gcc agg cgc agg gag tac ctc tac ctg ggc ggg ctg ctc tcg tcg Val Ala Arg Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser 80 85 90 95			287
25	ggg ctc tcc atc ctg ctc tgg ctg cag ctc gcc gcc tcc atc ttc ggc Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Leu Ala Ala Ser Ile Phe Gly 100 105 110			335
30	cac tcc gca acc agc ttc atg ttc gag gtc tac ttc ggg ctg ctc atc His Ser Ala Thr Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile 115 120 125			383
	ttc ctg ggc tac gtg gtg tac gac acg Phe Leu Gly Tyr Val Val Tyr Asp Thr 130 135			410
35	<210> 24 <211> 136 <212> PRT <213> Zea mays			
40	<400> 24 Trp Asn Ile Gly Val Arg Leu Thr Met Leu Gly Cys Ile Gly Ser Ile 1 5 10 15			
45	Asp Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Tyr Gly 20 25 30			
50	Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu 35 40 45			
55	Val Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Ala Phe 50 55 60			
60	Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Met Val 65 70 75 80			
65	Ala Arg Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly 85 90 95			
70	Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Leu Ala Ala Ser Ile Phe Gly His 100 105 110			
	Ser Ala Thr Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe 115 120 125			
	Leu Gly Tyr Val Val Tyr Asp Thr 130 135			
	<210> 25 <211> 463 <212> DNA <213> Triticum aestivum			
	<220> <221> CDS			

<222> (1)...(462)
<223> coding for BI1-protein

<400> 25
5 ttc tca ggt acg ttc cgc aat tcc cgg agc gac gat ttc gtg ctc tgc 48
Phe Ser Gly Thr Phe Arg Asn Ser Arg Ser Asp Asp Phe Val Leu Cys
1 5 10 15

10 gaa ctt cag cga gag ctc ccc cga tgc cgg gac gca acc ttg acg gtc 96
Glu Leu Gln Arg Glu Leu Pro Arg Cys Arg Asp Ala Thr Leu Thr Val
20 25 30

15 gta tac gtg atc cca ata gtg ggc cga ata aaa tct gcc gcg ggt gct 144
Val Tyr Val Ile Pro Ile Val Gly Arg Ile Lys Ser Ala Ala Gly Ala
35 40 45

20 tac ctg cac att gcc ctg aac atc ggt ggg atg ctg aca atg ctt gcg 192
Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu Thr Met Leu Ala
50 55 60

25 tgt atc gga acc att gcc tgg atg ttc tct gtg cca gtc tat gag gag 240
Cys Ile Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu
65 70 75 80

30 agg aag agg ttt ggg ctg ctg atg ggt gca gcc ctc ctg gaa ggg gct 288
Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala
85 90 95

35 tcg gtt gga cct ctg att gag ctt gcc ata gac ttt gac cca agc atc 336
Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe Asp Pro Ser Ile
100 105 110

40 ctc gtg aca ggg ttt gtt gga acc gcc atc gcc ttt ggg tgc ttc tct 384
Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Gly Cys Phe Ser
115 120 125

45 ggc gcc gcc atc atc gcc aag cgc agg gag tac ctg tac ctc gga ggc 432
Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly
130 135 140

50 ctg ctc tcc tcc ggc ctg acg atc ctg ctc t 463
Leu Leu Ser Ser Gly Leu Thr Ile Leu Leu
145 150

55 <210> 26
<211> 154
<212> PRT
<213> Triticum aestivum

60 <400> 26
Phe Ser Gly Thr Phe Arg Asn Ser Arg Ser Asp Asp Phe Val Leu Cys
1 5 10 15

65 Glu Leu Gln Arg Glu Leu Pro Arg Cys Arg Asp Ala Thr Leu Thr Val
20 25 30

70 Val Tyr Val Ile Pro Ile Val Gly Arg Ile Lys Ser Ala Ala Gly Ala
35 40 45

75 Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu Thr Met Leu Ala
50 55 60

80 Cys Ile Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu
65 70 75 80

85 Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala
90 95

90 Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe Asp Pro Ser Ile
100 105 110

95 Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Gly Cys Phe Ser

115	120	125		
Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly				
130	135	140		
5	Leu Leu Ser Ser Gly Leu Thr Ile Leu Leu			
	145	150		
10	<210> 27			
	<211> 388			
	<212> DNA			
	<213> Zea mays			
15	<220>			
	<221> CDS			
	<222> (3)...(386)			
	<223> coding for BI1-protein			
20	<400> 27			
	tc tgg aac atc ggc ggg acg ctg aca atg ctc ggt tgc gtc ggc agc			47
	Trp Asn Ile Gly Gly Thr Leu Thr Met Leu Gly Cys Val Gly Ser			
	1	5	10	15
25	atc gcc tgg ctc ttc tcg gtg ccc gtc tac gag gag agg aag agg tat			95
	Ile Ala Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Tyr			
	20	25	30	
30	ggg ctg ctg atg gcg gct gcc ctc ctg gaa ggc gct tcg gtc gga ccc			143
	Gly Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro			
	35	40	45	
35	ctc gtc aag ctc gcc gtg gaa ttt gac cca agc atc ctg gtg acg gcg			191
	Leu Val Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Ala			
	50	55	60	
40	ttc gtg ggg act gcc atc gcg ttc gcg tgc ttc tcc ggc gcg cca tgg			239
	Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Pro Trp			
	65	70	75	
45	tgg cag gcc agg gag tac ctc tac ctg ggc ggc tgc tct cgt cga ggc			287
	Trp Gln Ala Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Cys Ser Arg Arg Gly			
	80	85	90	95
50	tct cca tcc tgc tct ggc tgc agc tcg ccg cct cca tct tcg gca ctc			335
	Ser Pro Ser Cys Ser Gly Cys Ser Pro Pro Pro Ser Ser Ala Leu			
	100	105	110	
55	ggc ta			388
	Gly			
60	<210> 28			
	<211> 128			
	<212> PRT			
	<213> Zea mays			
65	<400> 28			
	Trp Asn Ile Gly Gly Thr Leu Thr Met Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile			
	1	5	10	15
	Ala Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Tyr Gly			
	20	25	30	
70	Leu Leu Met Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu			
	35	40	45	
	Val Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Ala Phe			

	50	55	60		
	Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Pro Trp Trp				
	65 65	70	75	80	
5	Gln Ala Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Cys Ser Arg Arg Gly Ser				
	85 85	90	95		
10	Pro Ser Cys Ser Gly Cys Ser Ser Pro Pro Pro Ser Ser Ala Leu Arg				
	100 105		110		
	Asn Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Leu Leu Gly				
	115 120		125		
15					
	<210> 29				
	<211> 1737				
	<212> DNA				
20	<213> Solanum tuberosum				
	<220>				
	<221> promoter				
	<222> (1)..(1737)				
25	<223> patatin promotor				
	<400> 29				
	aagcttatgt tgccatatacg agtagttgt gatggtatac ttcataaaact ttaactttagt 60				
	ttaaatttgt aatgataaaaa tttttattgt aaattaaaaa ttacttataa aattgggcat 120				
30	tataacatat gaaagacaaa ttgtgttaca tattttactt ttgactttaa tatgaatatt 180				
	tcaattaaaa tcattgtttt attttcttctt tcttttaca ggtataaaag gtgaaaatttg 240				
	aagcaaggat gattgcaagc tatgtgtcac cacgttattt atacttttga agaaattttt 300				
	acttataatgt ctttgttag gagtaattt tgatatgtt tagtttagatt ttcttgcata 360				
	ttatgcata gtataattttt agttatttt attatatgtt catgggtgaa ttttgatata 420				
35	aatattttg tcattaaata aattaattta tcacaacttg attacttca gtgacaaaaaa 480				
	atgtattgtc gtagtaccct tttttgttga atatgaataa tttttttat ttttgacaa 540				
	ttgttaattgt cactactttt gataatattt agtgcacat atgtcgctgg taaaagcaaa 600				
	cacttcagt gacaaaaataa tagatttat cacaatataa ttaacctttt ttataataat 660				
	aaattttatcc ctatattataa cattttaaatggg caaagtattt tttttatataa taaaaatata 720				
40	tctttatgtca cgatcgtagt gttgagtctt gaaatcataa tttttttat tttttttat 780				
	catgcgtgt aaaataaaacc tcaaaaaaggc cgttcgttcc atagagggggg tttttttat 840				
	accccaaccc tcaacaaaggc aaacccccc tcaacaaggc cattttttttt gctaaacaaat 900				
	ttcaagtctc atcacacata tattttttat ataataactaa taaagaatataa taaaaggaaag 960				
	gtttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1020				
45	tcgtcacaca aatattttttt tagtgcacaaa tgatgtttat atgtgtttat tttttttttt 1080				
	tcataatctt atttttttttt tgatgtttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1140				
	tccataaaaa aaaaatatctt ctcttctttt gtacgtttttt gttttttttt gttttttttt 1200				
	ataataactaa taaaaggaaatggg gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt 1260				
	taatatcaga gtcgtatcat tttttttttt atcgatataa ccctttttttt aactttttttt 1320				
50	aaccaattcc gataaggcga gaaatataatcat agtattttttt tttttttttt tttttttttt 1380				
	gtggggtaaa ccttcggcggc gacgtttttt ccattttttt gttttttttt gttttttttt 1440				
	ccttcggcggc aaaaacccctt ccctttttttt ggacattttttt gttttttttt gttttttttt 1500				
	cttcggcggc atatataatattttttt attatataat attatataat attatataat attatataat 1560				
	acatcaactaa cgacagtttc ggtttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt 1620				
55	ttgggttatgtt caaaactcaaa gttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1680				
	gctttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1737				
	<210> 30				
60	<211> 1317				
	<212> DNA				
	<213> Triticum aestivum				
	<220>				
65	<221> promoter				
	<222> (1)..(1317)				
	<223> germin 9f-3.8 gene promotor				
	<400> 30				
70	gaattttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 60				
	tgtcgatgttcc tccaaatgttcc tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 120				
	tatgtatgtttcc aagatattttttt gaaatataatggg gttttttttt gttttttttt gttttttttt 180				
	ggcggcggcggc ccatcatgtttcc tcgggggggggg gttttttttt gttttttttt gttttttttt 240				

ttctgaggag atgaccattt gaggcctttt agccagcccc aagaggtgca gaagcccact 300
 acccatttagg gtatgaccc agggtcattt tggactttgc acatgagtgg atggggatgc 360
 tttaccctcc atccagcagc caccaccaag ggtgacgaaa atcagttcat cctccaaagag 420
 5 agaagaagag agaaaaaccaa gagagcaagg gaagaagagg aagattgaag gaagaagaaa 480
 agggagctcc tc(cccaaggt tttgatggc catatccact atcttgtctc cttcaaactt 540
 cggttccacc atctttggta agattgttct aatccctagt tcttgagccc caaatcttg 600
 tgtgttcatc caagattcg aaatcttgcat gtatgagatc ctctagtgtc gtctagagaa 660
 gaattttgtt tatccccat ttgataatag tggaaagagga tttgggtggc ttcggcccat 720
 10 gggttttccc ctcaagttga ggggtttcc acgtaaaatc tggtgtctc ttgtgtatgc 780
 ttggtgttgc ccagaaactt actccatcca caagacacta ggggcagtt cttttggaa 840
 attctcccg aattgaccct ctccccagct tctcccgaaa ttgtcaactcc attttctt 900
 acaattccta gctagttaa gtcttaattt ttaggaattt taaaaaaaata tcaagtggca 960
 attctgggag aagctgggaa gggggtaat tctggaaatggaa ttgccccaaa gaactggccc 1020
 15 taggctgagg agtgtcttgc ctgctgctta acatttctg cctccatata tggtgttgca 1080
 tatgtttcct tccgtgctaa gcaacatcc tttagttgtt acatgatgtg gtgctgagat 1140
 tactttgtt tcgctgcagt tatcagttaa ccacaagtgc atttgcgtgc taattcccaa 1200
 caatatgccca cccgcaactt atccaccata gctcagcagc aaccaccaat gccatagaca 1260
 ctctcggtaa acaacactgtt gcttatcagt cttagctaagc gtgctgcata gcaagca 1317

20 <210> 31
 <211> 959
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

25 <220>
 <221> promoter
 <222> (1)..(959)
 <223> CAB-2 promotor

30 <400> 31
 gaattcatgt gtgagggcaa ttagtgattt taaaaataaa attgtgtttt gtaaaaaact 60
 tttactgtcg aaatttattt ggggtatgaa aaaatcgat aactacgaaat gatagcttaa 120
 35 agagtttcta tcaaagtgtat tgaggaatag tttgttgc当地 attaaacctc taacaaaatg 180
 ttttctgtt tgggtttca tctctacaaa tttgaattt tatgtatgaaat tagaaagata 240
 gaatgatgtt cttagattt taaaagggtt ttcagtttca caaaacatg tactagaatc 300
 atgattaaaa atttacaagg tacatattgtt ctaaaccat gatgttggaaat accaggatg 360
 atattttc agtgtttgaa caatcaattt gatagttttt atgtttctgc aaaaatatgca 420
 40 aataatcagt gtttttgatgtt ctttgatctt tgatttaaa gaaaaaacaa ctgagttca 480
 aggttaaattt aattacatta ttcatgagat ttatcaggtt agtggataaaa ctgacaatgg 540
 aatcaatgtt attgttaaattt ggtatgtatg ttggacttctt aatgttactc tctatgatgt 600
 ttcggtcac ggtatcacac tatcttact tttatttaaa ggaaagatca cacaataaag 660
 ttatctctat tcagaactat taagctgtt caaaaagact tgcaacatgt ggtctcgaaa 720
 45 tggttggct gcaatggaaa aatcatagca aaagcttagt gactagagac tgccacataa 780
 gaatagttaa cgtttaaaacc aaaaatctcaa aatccaaatg agttaaagaga tatagattac 840
 ttcatagata acaaacgttta ctcgcattt ttcttatataa tccaaaccata cctaaccatt 900
 ttcaatcact ctcactcaca agttagtcac caaaaaaaaaaaa aaaaacacaa aaagtttca 959

50 <210> 32
 <211> 445
 <212> DNA
 <213> Zea mays

55 <220>
 <221> promoter
 <222> (1)..(445)
 <223> PPCZm1 promoter

60 <400> 32
 gaattccaaa aatagacacg gcaattttctt tattcacaga aaaaatataa ctacaactaa 60
 tccccaaatgc cacagggttcc agggatcaat ctgcaaaaactt aaaaagtactt ttacagtgtt 120
 acttggatgtt agtcatgtt ccatgagaga ggcgcacggc tcagcaaaagc aacataaaaat 180
 65 tctccaaacg ggccccggca cacacatca ccatcacccc cggggtcccc acccagtaca 240
 aatagacacg cacactcccc actccccaccatctccggc ggcgcacaccg cccaaatcagc 300
 caatctccctc ctccctccctc gctctcagac gggcggcggc tgccatcact ctccacttcc 360
 cacgcccggc gggggctcggc aggcggcaga gaattgtctg tgccggccggg tggaaatttg 420
 attcggtcg attccgtcgcc ccgcgc 445

70 <210> 33
 <211> 5455
 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

5 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: recombinant expression vector pUBiBI-1

<400> 33

10	ggggatcctc	tagatcgac	ctgcaggcgg	ccgcaactgt	gattaggatt	ccaacgcgag	60
	ccaggacaag	cgaggaacct	tgcgtgcgag	gcgaggccgc	cccgcctcga	ttcgattcga	120
	cgcgcaggcg	caggcgcagg	gatggacgcc	ttctactcga	cctcgtcggc	ggcgccgagc	180
	ggctggggcc	acgactccct	caagaactc	cgccagatct	ccccccgcgt	gcagtcccac	240
	ctcaagctcg	tttacctgac	tctatgttt	gcaactggct	catctgcggcgt	gggtgtttac	300
	ctcacattt	ccctgaacat	cgggcggtat	ctgacaatgc	tcgtctgttg	cggaactatc	360
15	gcctggatgt	tctcggtgcc	agtctatgag	gagaggaaga	ggtttgggt	gctgatgggt	420
	gcagccctcc	tggaaaggggc	ttcgggttgg	cctctgattt	agcttgcatt	agactttgac	480
	ccaagcatcc	tctgtacagg	gtttgtcgg	accggccatcg	cctttgggt	cttctctggc	540
	ggcgccatca	tcgccaagcgc	cagggagttac	ctgtacccctcg	gtggcctgt	ctcgctggc	600
	ctgtcgatcc	tgctctggct	gcagtttgc	acgttccatct	ttggccactc	ctctggcagc	660
20	ttcatgtttt	aggtttactt	ttggcttgc	atcttcttgg	gttacatgtt	gtacgacacg	720
	caggagatca	tcgagagggc	gcaccatgdc	gacatggact	acatcaagca	cgcctcacc	780
	ctcttcaccc	acttttgtc	cgtcctcgtc	cgagtccctca	tcatcatgtc	caagaacgca	840
	ggcgacaagt	cggaggacaa	gaagaagagg	aagaggggg	cctgaacgtw	tctccgcac	900
	atgttagatac	cgtcaccgcg	tcgacctgca	ggcatgccc	ctgaaatcac	cagtctctct	960
25	ctacaaatct	atctctctca	taataatgt	tgatgttttc	ccagataagg	gaattaggg	1020
	tcttagatgg	tttcgtctat	gtgttgagca	tataagaac	ccttagtat	tattttgtatt	1080
	tgtaaaaatcc	tttctatcaat	aaaaatttca	attcttaaaa	ccaaaatcca	tggggtaccg	1140
	agctcgaattt	caagcttggc	actggccgtc	gttttacaac	gtcgtgactg	ggaaaaccct	1200
	ggcggttaccc	aacttaatcg	cettgcagca	catccccctt	tcgcccagtg	gcgtaatagc	1260
30	gaagaggccc	gcaccgatcg	cccttcccaa	cagttgcgc	gcctgaatgg	cgaatggcgc	1320
	ctgatcggtt	attttctctt	tafcatctg	tgcggtattt	cacacccgc	atggtgcact	1380
	ctcagtacaa	tctgtctgt	tgccgcata	ttaaggcc	cccgacaccc	gccaacaccc	1440
	gctgacgcgc	cctgcacggc	ttgtctgtc	ccggcatcc	tttacagaca	agctgtgacc	1500
	gtctccggga	gtgcgtatgt	tcagaggttt	tcacccgtat	caccgaaacg	cgcgagacga	1560
35	aaggccctcg	tgatacgcct	attttata	gttaatgtca	tgataataat	gtttcttag	1620
	acgtcagggt	gcacttttcg	gggaaatgt	cgcggaaaccc	ctatittgtt	attttctaa	1680
	atacatc	atatgtatcc	gctcatgaga	caataaccct	gataatgtct	tcaataatat	1740
	tgaaaaaagg	agagatgtag	tattcaacat	ttccgttgc	cccttattcc	cttttttgcg	1800
	gcatttttgc	ttccctgttt	tgctcacca	gaaacgctgg	tgaaagtaaa	agatgtctaa	1860
40	gatcagtgg	gtgcacagg	gggttacatc	gaactggatc	tcaacagcgg	taagatctt	1920
	gagagttttc	gccccgaaga	acgttttcc	atgtatgtca	cttttaaagt	tctgtatgt	1980
	ggcgcggtat	tatcccgat	tgacgcggg	caagagcaac	tcggtcggc	catacactat	2040
	tctcagaatg	acttgggt	gtactcacca	gtcacagaaa	agcatcttac	ggatggcatg	2100
	acagtaagag	aattatgcag	tgctgcccata	accatgagtg	ataacactgc	ggccaactt	2160
45	cttctgacaa	cgatcgagg	accgaaggag	ctaaccgc	ttttgcacaa	catggggat	2220
	catgtaaactc	gccttgcata	ttgggaaccc	gagctgtat	aaggccatacc	aaacgacgag	2280
	cgtgacacca	cgatccgt	agcaatggca	acaacgttgc	gcaaaactatt	aactggcgaa	2340
	ctacttactc	tagctcccg	gcaacaatta	atagactgg	tggaggcgga	taaagttgca	2400
	ggaccacttc	tgcgctcg	ccttccggct	ggctggttt	ttgctgat	atctggagcc	2460
50	ggtgagcg	ggtctcg	tatcattgca	gcactggggc	cataggtt	gccctcccg	2520
	atcgttagta	tctcacgac	ggggagtc	gcaactatgg	atgaacgaaa	tagacagatc	2580
	gctgagatag	gtgcctc	gattaagcat	tggtaactgt	cagaccaatg	ttactcatat	2640
	atacttttgc	ttgat	atcttattt	taattttaaa	ggatcttagt	aaagatcctt	2700
	tttgataatc	tcatgacca	aatcccttta	cgtgagttt	cgttccact	agcgtcagac	2760
	cccgtagaaa	agatcaaagg	atcttcttgc	atcttctttt	ttctgcgcgt	aatctgtc	2820
55	ttgcaaaacaa	aaaaaccacc	gctaccagcg	gtggtttgc	tgccggatca	agagctacca	2880
	actctttttc	cgaaggtaac	tggcttc	agagcgcaga	tacaaaat	tgttcttcta	2940
	gtgttagccgt	agttaggcca	ccacttca	aactctgt	caccgcctac	atacctcgct	3000
	ctgtaatcc	tgttaccat	ggctgtctgc	agtggcata	agtctgtct	taccgggtt	3060
	gactcaagac	gatagttacc	ggataaggcg	cagcggcgtcg	gctgaacccgg	gggttgcgtc	3120
60	acacagccca	gcttggagcg	aacgaccc	accgaactga	gatacctaca	gcgtgagctt	3180
	tgagaaaagcg	ccacgcttcc	cgaagggaga	aaggccgaca	ggtatccgt	aaggccgagg	3240
	gtcgacacag	gagagcgcac	gagggagctt	ccagggggaa	acgcctggt	tctttatagt	3300
	cctgtcggtt	ttccgcaccc	ctgacttgc	cgtcgat	tgtgtatgc	gtcagggggg	3360
	cgggacccat	ggaaaaacgc	cagcaacgc	gccttgc	ggttcttgc	cttttgcgt	3420
65	tttttgc	acatgttctt	tcctgcgtt	ccccctgtatt	ctgttgat	ccgtattacc	3480
	gcctttgat	gagctgatac	cgctcgcc	agccgaacga	ccgagcgc	cgagtca	3540
	agcgaggaag	cggaagagcg	cccaatacgc	aaaccgc	tccccgc	ttggccgatt	3600
	cattaatgca	gctggcacga	cagggttccc	gactggaaag	cgggcagt	gcccacgc	3660
	attaatgt	gttagctac	tcattagca	ccccaggctt	tacactt	gtctccgg	3720
70	cgatgttgc	gtggaaatgt	gagcggtt	caatttcaca	caggaaacag	ctatgacat	3780
	gattacgaaat	tccatgcct	cgaggatca	acatgtttag	atacatgaa	taacatgt	3840
	ctacggttt	ataattcttgc	agttgtt	tactgttact	tagatagat	tatatacatg	3900
	cttagatata	tgaagtaaca	tgctccata	gttcttttaa	tcattatt	gtacctat	3960

attctaaataa atcagtatgt tttaaattat ttgatttta ctggtactta gatagatgt 4020
 tatatacatg ctcacacatg cttagataca tgaagtaaca tgctgtacg gtttagtcat 4080
 tattgagtgc cttataatttc taataaatca gtatgtttt aattatttt attttactgg 4140
 tacttagata gatgtatata tacatgctca aacatgctt gatacatgaa gtaatatgt 4200
 5 actacggttt aattgttctt ggtacccat attatctat aaatcagtat gttttaattt 4260
 atttcgattt tactggtact tagatagatg tataatataca tgcttagata catgaagtaa 4320
 catgctacta cggttaattt gttcttgaat acctatataat tctaataat cagtatgtt 4380
 taaattattt cgattttact ggtacttata tagatgtata tatacatgtc cgaacatgt 4440
 tagatacatg aagtaacatg ctacatataat attataataa atcagtatgt cttaaattat 4500
 10 tttgattta ctggtactta gatagatgt tatacatgtc caaacatgtc tagatacatg 4560
 aagtaacatg ctactacggt ttaatcatta ttgagttacat atataatcata ataaatcagt 4620
 atgtttcaa ttgttttgc ttactgtt cttagatata tttatataat catgctcga 4680
 catgcttaga tacgtgaagt aacatgctac tatggtaat ttgttgcag tacctatata 4740
 ttctaaataaa tcagttatgtt ttaaattatt tcgattttac ttggtacttag atagatgtat 4800
 15 atatacatgc tccaacatgc ttagatacat gaagtaacat gctactacgg ttaatcgtt 4860
 ctggatgtacc tataatattct aataaatcag tatgttttaa attatcttgc ttgttactgtt 4920
 acttagatg atgtatatac atgcttagat acatgaagtg acatgtctact atgattttat 4980
 cgttcttgcg tacctatata ttctaaataaa tcagttatgtt ttaaattatt ttgttattttac 5040
 20 tggtacttag atagatgtat atatacatgc tccaacatgc ttagatacat gaagtaacat 5100
 gctactacgg ttaatcattt cttgagttacc tataatattct aataaatcag tatgtttta 5160
 attatttga tattactggt acttaacatg tttagataca tcatatagca tgcacatgtc 5220
 gctactgttt aatcattcgt gaataacctat atattctat atatcagtat gtcttcta 5280
 tattatgtt ttgatgtact tttatggtgg catatgctgc agctatgtgt agattttga 5340
 25 tacccttgtt gatgagcatg catggccct tcatagttca tatgtgtttt atttccttgc 5400
 agactgttct tttttgttga tagtcacccct gttgtttgtt gattctttagt caccc 5455

<210> 34
 <211> 12633
 30 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: recombinant
 35 expression vector pLol14UbiBI-1

 <400> 34
 aattcaactgg ccgtcgttt acaacgactc agagcttgcac aggaggccccg atctagtaac 60
 atagatgaca ccgcgcgcga taatttatcc tagttgcgc gctatatttt gttttctatc 120
 40 gcgtattaaa tgtaataattt cgggactcta atcataaaaaa cccatctcat aaataacgtc 180
 atgcattaca tgtaattat tacatgctta acgttaattca acagaaattt tatgataatc 240
 atcgcaagac cggcaaacagg attcaatctt aagaaaactttt attgccaat gtttgaacga 300
 tcggggatca tcgggtctc tggcggaaac tccacggaaa tatccgaacg cagcaagatc 360
 tagagtttgg gttccgcctca gaagaactcg tcaagaaggc gatgcgcgtc 420
 45 gaatcgggag cggcgatacc gtaaaggcagc aggaaggcggtt cagccatcc gcccggca 480
 tcttcagcaa tattcacgggtt agccaaacgtt atgtcctgtt agccgtccgc cacacccagc 540
 cggccacagt cgatgaatcc agaaaagcgg ccattttcca ccatgatattt cggcaagcag 600
 gcatcgccat gggtcacgac gagatcctcg ccgtcggcga tgcgcgcctt gaggctggcg 660
 aacagttcgg ctggcgcgag cccctgtatgc tcttcgttcca gatcatcctg atcgacaaga 720
 50 ccggcttcca tccgagttacg tgctcgctcg atgcgtatgtt tgcgttgggt gtcgaatggg 780
 caggtagccg gatcaagcgtt atgcagccgc cgcattgtat cagccatgtt ggataacttcc 840
 tcggcaggag caaggtgaga tgacaggaga ttctgcccccc gcaactcgcc caatagcagc 900
 cagtccttc ccgcttcgtt gacaacgtcg agcacagctg cgcaaggaac gcccgtcg 960
 55 gccagccacg atagccgcgc tgcctcgatcc tgcagttcat tcagggcacc ggacagggtc 1020
 gtcttgacaa aaagaaccgg ggcgccttc gctgacagcc ggaacacggc ggcacatcag 1080
 cagccgattt tctgttgc ccagtcatag ccgaatagcc tctccaccca agcggccgga 1140
 gaacctgcgtt gcaatccatc ttgttcaatc atgcggaaacg atccagatcc ggtcggatgtt 1200
 atttggattt agagtgataa tgagactcta attgatacc gggggattt tatggaaactgt 1260
 cagtggagca tttttgacaa gaaatatttgc ttagctgatc gtgacccctt ggcactttt 1320
 60 aacgcgcacat aatggttctt gacgtatgtt cttagctcat taaactccatc aaacccgcgg 1380
 ctgagttggctt cttcaacgtt tgccgttctc tcaatccatc acgtaaaacg gttgtcccg 1440
 cgtcatcgcc gggggcttca acgtgactcc cttaaattctc cgctcatgtat cagattgtcg 1500
 tttcccgctt tcagtttataa ctatcgtgtt ttgacaggat cctgcttgggt aataattgtc 1560
 attagattgtt tttatgtatc agatgcactc gaaatcggcc aatttttagac aagtatcaa 1620
 65 cggatgttaa ttccatgtatc taaagacgtt cgcattgtt tattaaatgtt tctaagcgtc 1680
 aattttgttta caccacaata tttccgttca ccagccggcc aacagctccc cgaccggcag 1740
 ctcggcacaat aatcaccacac cgttaccacc acgcccggcc gccgcattgtt gttgaccgt 1800
 ttccggccca ttccggagtt cggcgatcc ctaatcgtatc accgcaccccg gaggccggcgc 1860
 gaggccggcca aggccggagg cgtgaagttt ggcccccggcc ctaccctcac cccggcaccag 1920
 atcgccgcacg cccgcgcacgtt gatcgaccac gaaaggccgc cctgttgcgaaaga ggcggctgc 1980
 70 ctgcttggcg tgcattcgctc gaccctgtt cgcgcactt ggcgcacgtt ggcgcacgtt gaaaggatc 2040
 cccaccggagg ccaggccggc cggcgatcc cgtgaggacg cattgaccga gggccgcac 2100
 ctggccggccg ccgagaatga acgccaagag gaaaccgcac caggacggcc 2160

aggacgaacc gttttcatt accgaagaga tcgaggcgga gatgatcgcg gccgggtacg 2220
 tggcggccac gtctcaacc tgccgcgtca taaaatctg gcccgggt 2280
 ctgatgccaa gctggcgccc tggccggcca gcttggccg tgaagaaacc gagcgcgc 2340
 gtctaaaaag gtatgtgtt ttttagtaaa acagcttgcg tcatcggtc gtcgtata 2400
 5 tgatgcgtat agtaaaaaaa caaatacgcg aaaaaaaaaa atgaaggta tcgctgtact 2460
 taaccagaaa ggccgggtcg gcaagacgc catcgcaacc catctacccc gcccctgca 2520
 actcgccggg gcccgttgc tgtagtgcg ttccgatccc cagggcagt cccgcgtatt 2580
 ggcggccgtg cgggaagatc aaccgctaac cggtgtccg atcgaccgcg cagcgttgc 2640
 10 ccgcgcgtg aaggccatcg gccggcgca ttctgtatcg atcgacggag cggcccgagg 2700
 ggcggactt gctgtgtccg cgatcaaggc agccgacttc gtgtgttgcgatcc cgggtcaggc 2760
 aaggcccttac gacatatggg ccacccggca cctgggtggag ctggtaaagc agcgcatttg 2820
 ggtcacggat ggaaggctac aaggccctt tgctgtgtcg cgggcgtatca aaggcacgcg 2880
 15 catcgccgtt gaggttgcggc aaggcgatcc cgggttgcgatcc tgccccatcc ttgagtcccg 2940
 tatcacgcag cgcgtgagct acccaggcac tgccggccgc ggcacaaccg ttcttgaatc 3000
 agaaccgcgg ggcgcgtcg cccgcggagg ctggcgctg gccgtgaaa ttaaatcaaa 3060
 actcatttga gttaatgagg taaagagaaa atgagcaaaa gcacaaaacac gctaagtggc 3120
 ggcgcgtccgc ggcgcacgcg cagcaaggct gcaacgttgg ccaggctggc agacacgc 3180
 gccatgaagg gggtaactt tcagttgcg gccggaggatc acaccaactg gaagatgtac 3240
 20 gccgttgcgc aaggcaagac cattaccgcg ctgtatctg aatacatcgc gcagctacca 3300
 gagtaaatga gcaaatgaat aaatgtatcg atgaattttt ggggttggaa gaggcggcat 3360
 gaaaaatcaa gaacaaccag gcacccgcgc cgtggatatcg cccatgtgtg gaggaaacggg 3420
 cggttggcca ggcgttaagcg gctgggttgt ctgcccggcc tgcaatggca ctggaaacccc 3480
 caagcccgag gaatcgccgt gaggcggtcgc aaaccatccg gcccgttaca aatcgccgcg 3540
 25 ggcgtgggtg atgacgttgcg ggagaaggatc aaggccgcgc aggccgcggca gccggcaacgc 3600
 atcgaggcag aaggcacgcgc cgggttgcgatcg tggcaaggcg cgcgtatcg aatccgc 3660
 gaatccgcgc aaccgcgcgc agccgggtcg cgcgttgcgatcc ggaaggccgc caagggcgac 3720
 gagcaaccag attttttgcg tccgtatgcgatcc tattgtatcg gcaacccgcgatcc tagtcgc 3780
 atcatggacg tggccgtttt ccgttgcgtcg aagcgttgcgatcc gacgagctgg cgaggtgtac 3840
 30 cgctacgcgc ttccagacgg gcacgttgcgatcc gtttccgcgatcc gcccggccgg catggccagt 3900
 gtgtgggatt acgacgttgcgacttgcgatcc gtttccgcgatcc taaccgaatc catgaaccga 3960
 taccggaaag ggaaggggaga caagccgcgc cgcgttgcgcgt gtcacacatcg tgcggacgt 4020
 ctcaagtttgcgatcc gccggcgacgc cgtatgcgcgatcc aaggcaaaaacg acgacgttgcgatcc agaaacctgc 4080
 attcggttacccacaccgcgc cgttgcgtatcc gaggcgatcc gcaaggccaa gaacggccgc 4140
 35 ctgggtacgg tatccgaggg tgaaggcttgcgatcc gtttccgcgatcc aacatgtcg aagagcgaa 4200
 accggccggc cggaggatcatcg cggatcgatcc gtagctgatcc ggtatgtaccg cgagatcaca 4260
 gaagggcaaga accccggacgt gctgtatccgcgatcc caccggatcc accttttgcgatcc gatcccgccgc 4320
 atcggccgtt ttctctaccgcgatcc cctggcgcgcgatcc cgcggccgcgcgatcc gcaaggccaa agccagatgg 4380
 ttgttcaaga cgtatcgatcc gacgttgcgatcc gtcggccggatcc gatccgttgcgatcc gttctgtttc 4440
 40 accgtgcgc aagtatgcgatcc gtcggatcc gtcggccggatcc gatccgttgcgatcc aacatgtcg aagatgggg 4500
 gggcaggctg gcccgtatccgcgatcc aatgtatcgatcc gcaaggccaa acaccatgcgatcc gtttccgcgatcc gggaggaggcg 4560
 gcccgttccgcgatcc aatgtatcgatcc gcaaggccaa acaccatgcgatcc gtttccgcgatcc gggaggaggcg 4620
 45 cgaaaaggatc tctttccgtg ggtatgtatcgatcc gtcggccggatcc gatccgttgcgatcc gtttccgcgatcc gggaaaaggatc gtacattggg 4680
 aaccggaaacc cgtatcgatcc gacgttgcgatcc gtcggccggatcc gatccgttgcgatcc gtttccgcgatcc acacatgtaa 4740
 gtgactgtatcc taaaagagaaa aaaaggcgatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc aaaaacttccgcgatcc aaaaacttccgcgatcc 4800
 50 aaaaacttccgcgatcc gtcggccggatcc gatccgttgcgatcc gtttccgcgatcc gggaggaggcg 4860
 ctgcaaaaaggatc cgccttaccgcgatcc tcggctgtcgatcc cgccttccatccgcgatcc gcccggccgcgatcc gcccggccgcgatcc 4920
 cctatcgccgcgatcc cgcgtggccgcgatcc ctcaaaaatgcgatcc gtcggccgtatcc gggaggaggcg 4980
 55 cgcggacaagg cgcgcgcgcgcgatcc gccactcgatcc cgcggccgcgcgatcc cacatcaagg caccatgcgatcc 5040
 cgcgcgttgcgatcc ggtatgtatcgatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc cgcggccgcgcgatcc agacggatcc 5100
 50 agtttgttgcgatcc taatcgatcc gtcggccggatcc gatccgttgcgatcc gtttccgcgatcc cgcggccgcgcgatcc 5160
 tggcgggtgtt cggggcgatcc ccatgatcc gtcacgtatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc 5220
 cttaactatgcgatcc cggcatcgatcc gtcggccggatcc gatccgttgcgatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc 5280
 60 ccgcacatcgatcc gtcggccggatcc gatccgttgcgatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc 5340
 gactcgatcc gtcggccggatcc gatccgttgcgatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc 5400
 65 atacgttatccgcgatcc ccacagaatcc agggatcc gtcggccggatcc gatccgttgcgatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc 5460
 caaaaaggatcc ggaaccgtatcc aaggccgcgcgatcc ttgtatcgatcc gtcggccggatcc gatccgttgcgatcc gtttccgcgatcc 5520
 cctatcgatcc gtcggccggatcc gatccgttgcgatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc 5580
 taaagatacc accgttgcgatcc gtcggccggatcc gatccgttgcgatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc 5640
 70 cgccttaccgcgatcc gataccgtatcc gtcggccggatcc gatccgttgcgatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc 5700
 tcacgtatcc ggtatgtatcgatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc 5760
 gaaccggccgcgatcc ttccatccgcgatcc cgcgtggccgcgatcc ttatccgcgatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc 5820
 cccgtatccgcgatcc acgacttgcgatcc gtcggccggatcc gatccgttgcgatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc 5880
 aggtatgtatcgatcc gtcggccggatcc gatccgttgcgatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc 5940
 aggacatcgatcc tgggtatcgatcc gtcggccggatcc gatccgttgcgatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc 6000
 65 agcttgcgatcc cggccggatcc aaccatcgatcc gtcggccggatcc gatccgttgcgatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc 6060
 cagattacgcgatcc gcaaggaaaaaa aggatcgatcc gtcggccggatcc gatccgttgcgatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc 6120
 gacgtatccgcgatcc gcaaggaaaaaa ctcacgtatcc gtcggccggatcc gatccgttgcgatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc 6180
 aatttgcgatcc gggcttattatcc gtcacgtatcc aaaataataaa aaggcagactt gacgttgcgatcc gtttccgcgatcc 6240
 tttggctgtatcc gcaattatgcgatcc tgcttagtgcgatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc 6300
 70 agccggcgatcc gtcggccggatcc aatttccgcgatcc gtcggccggatcc gatccgttgcgatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc 6360
 tcccttgcgatcc cgtatcgatcc aatttccgcgatcc gtcggccggatcc gatccgttgcgatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc 6420
 tcccttgcgatcc caagatcgatcc gtcggccggatcc gtcggccggatcc gatccgttgcgatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc 6480
 aggccgtccatcc gtcggccggatcc gtcggccggatcc gatccgttgcgatcc gtttccgcgatcc gtttccgcgatcc 6540

agtatgtctt aaattatctt gatTTTactg gtacttagat agatgtatat acatgcttag 10980
 atacatgaag taacatgcta ctatgattta atcgTTCTG agtacacctata tattctaata 11040
 aatcagtatg ttttaatta tttgatttt actggtaactt agatagatgt atatatacat 11100
 5 gctcgaacat gcttagatac atgaagtaac atgctactac ggTTTAATCA ttcttgagta 11160
 cctatataatt ctaataaaatc agtatTTT taattttt gatattactg gtacttaaca 11220
 tgTTtagata catcatatac catgcacatg ctgctactgt ttaatcattc gtgaataact 11280
 atatattcta atatatacgt atgtCTTCTA attattatga ttttgatgtt cttgtatgtt 11340
 ggcatacgct gcagctatgt gtagatttt aatacccagt gtgatgagca tgcataGGCGC 11400
 10 cttcatagtt catatgctgt ttatttcctt tgagactgtt ctttttggTT gatagtcaCC 11460
 ctgttggTT gtgattctt tgcacCCGGG gatcCTCTAG agtgcACCTG caggcGGGCGG 11520
 cactagtatg taggatttcca acgcgagccg ggacaAGCGA ggaacCTTCG gtgcgaggCG 11580
 aggccGCCCC gctccGATTt gattcGacGC gcaggcGGCG ggcgcaggat ggacGCTTC 11640
 tactcgacct cgTCGGCGGC ggcgagcGGC tggggCCACG actccCTCAA gaacttCCGC 11700
 15 cagatctccc cccGCGTGCa gtcccacCTC aagctcgTT acctgacttC atgctttGCA 11760
 ctggcctcat ctgcccgtggg tgcttaccta cacattGCC tgaacatCgg cgggatGCTG 11820
 acaatgctcg ctgtgtcgg aactatgcCC tggatgttC cggTGCCTG ctatgaggAG 11880
 aggaagaggt ttgggctgt gatgggtgc gcccTCTTG aaggggCTTC ggttggACT 11940
 ctgattgagc ttgcccataga ctttgacCC agcataCTG tgacagggtt tgcggAAACC 12000
 20 gccatcgcct ttgggtgctt ctctggcGCC gccatcatG ccaagcGAG ggagtacCTG 12060
 tacctcggtt gcctgcttC gtctggcCTG tcgatCCTG tctggCTGCA gtttGTCACG 12120
 tccatctttg gccactcCTC tggcagCTC atgtttgagg tttactttgg cctgttGATC 12180
 ttcctgggtt acatgggttA cgacacGcAg gagatcatG agaggGcGA ccatGGcAC 12240
 atggatACA tcaAGCACGc cctCACCCtC ttcaccGACT ttgttGCGT cctcgTCCG 12300
 25 gtcctcatc tcatgcttAA gaacGcAGGC gacaAGTcGG aggacaAGAA gaagAGGAAG 12360
 aggGGGCTCt gaacGtwtC cccgcacatg tagataccgt caccGcGTG acctGcAGG 12420
 atgcccGCTG aaatcaccAG tctcttCtA caaatctatC tctctatCaa taatGtGtA 12480
 gtagtttcca gataagggAA tttagggttC tataagggtt cgcctatGtG ttgagcatat 12540
 aagaAAACCT tagtatgtat ttgttatttGt AAAATACTC tatcaataAA atttctaatt 12600
 30 cctaaaacca aaatccAGtG ggtacGAGC tCG 12633

<210> 35
 <211> 5598
 <212> DNA
 35 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: recombinant expression vector pOXoBI-1

40 <400> 35
 ggggatcCTC tagagtCgAC ctgcaggcgg ccgcactagt gattaggatt ccaacGcGAG 60
 ccaggacaAG cgaggAACCT tgcgtgcgg gcgaggCCG cccGCTCCGA ttcgattcga 120
 cgcgcaggcG caggcgcagg gatggacGcC ttctactGA cctcgTCGGC ggCGGcGAGC 180
 45 ggctgggCC acgactCCt caagaACTC ccggcAGAtC ccccccGGCt gcaGtcccAC 240
 ctcaagCTG ttacCTGAc tctatGCTt gcaCTGGCt cAtctGCGt gggGtCttAC 300
 ctacacattG ccctGAACat cggcGGGAtG ctgacaAtGc tcgcttGtGt cggAAactAtC 360
 gcctggatgt tctcggtGCC agtctatGAG gagAGGAAGA gtttGGGtC gctgatGGGt 420
 gcagccCTCC tggAAAGGGC ttCGGTTGGA cctctGATTG agcttGccat agactttGAC 480
 50 ccaagcAtCC tctgtacAGG gtttGTCGGA accggccatCg ctttGgggtG ctttCtGgC 540
 ggcgcAtCA tCGCCAAAGC caggGAGtAC ctgtacCtCg gtggGctGt ctcgtctGGC 600
 ctgtcgatCC tgcTCTGgtC gcaGtttGtC acgtccAtCt tttggGactC ctctGGcAGC 660
 ttcatGtttG aggtttactt tggcctGttG atcttCtGtG ggtacatGgt gtacGacAcG 720
 caggAGAtCA tcgAGAGGGC gcAccatGGC gacAtGGAct acatCAAGCA cggccCTAcc 780
 55 ctttcAccG actttGtGc cgtcCtCtGc cgaGtCtCtA tcAtCAtGtCt caAGAAcGcA 840
 ggcgcacaAtG cggaggACAA gaAGAAAGAGG aAGAGGGGt CctGAAcGtW tctccGcAc 900
 atgttagatac cgtcacCCGc tgcacCtGc ggcAtGccCt gcaAAatCac cagtCtCtCt 960
 ctacaaAtAtC AtCtCtCtCA taataAtGtC tgatGtCtC ccAgAtAAG gaaAttagGt 1020
 tcttataGGG ttCGtCtAt gtGttGAGCA tataAGAAAC ctttagtAtG tatttGtAtt 1080
 60 tgtaAAAtAC ttctatCAAt AAAAtttCtA attCtAAAtt ccaAAAtCCa gtggGtAccG 1140
 agctcgAAAtt caagCttGGC actGGCCGtC gtttacaAC gtcgtGactG ggAAAACCT 1200
 ggcgttacCC AacttaAtCg cttGcAGCA catccccCTt tcgcCAGCtG gCgtAAtAGC 1260
 gaAGAGGGCC GcAccGAtCg cccttCCCA cAgTtGcGA gCtGAtAtG gAAtGAGGt 1320
 ctgatGCGtG AttttCtCtCt tacGcatCtG tgcGgttAtCtG cacaCCGcat AtGtGcAcT 1380
 65 ctcagtaCtA tctGtCtGtA tgccGcatGtA taaGccAGC cccGacACCC gccaACACCC 1440
 gctgacGcGC ctcGacGGGc ttGtCtGtCt ccGGcAtCtG cttacAGAcA agtGtGacc 1500
 gtctccGGGA gtcGatGtG tcAGAGGtTt tcAccGtCt caccGAAACG cgcGAGAGcA 1560
 aaggGcCTG tgataAcGcCt AttttAtAG gttAAtGtCtA tgataAtAAt ggttCttag 1620
 acgtcaggGtG gcacttttG gggAAAtGtG cgcggAAACCC ctattGtTt AttttCtAA 1680
 atacattCAA atatGtAtCC gtcAtGAGA caataAAcCt gataAAAtGtC tcaAtAAAt 1740
 tgaaaaAGGA agatGtAGAG tattCAACt ccTcCGtGtG cccttAttCC ttTTTtGCG 1800
 gcatttGCC ttccTgttt tgctcAccCA gaaAcGcTGG tGAAAGtAA AgatGtGAA 1860
 gatcagttGG gtcGacGAGt gggttacAtC gaaAcGtGAtC tcaAcAGcGG taAGAtCt 1920

gagagtttc gccccgaaga acgtttcca atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt 1980
 ggcgcgttat tatcccgat tgacgccgg caagagcaac tcggcgcgc catacactat 2040
 tctcagaatg acttgggtga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg 2100
 acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggcacaactt 2160
 5 cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa catggggat 2220
 catgtaactc gccttgatcg ttgggacccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag 2280
 cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttc gcaaactatt aactggcgaa 2340
 ctacttactc tagcttcccgg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca 2400
 10 ggaccacttc tgcgctcgcc cttccggct ggctgggat ttgctgatata atctggagcc 2460
 ggtgagcgtg ggtctcgccg tatcatggca gcactggggc cagatggta gccctcccg 2520
 atcgttagta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc 2580
 gctgagatag gtgcctact gattaagcat tgtaactgt cagaccaatg ttactcatat 2640
 atactttaga ttgataaaaa acttcattt taatttaaaaa ggatcttagt gaagatcctt 2700
 tttgataatc tcatgaccaa aatccctaa cgtgagttt cgttccactg agcgtcagac 2760
 15 cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatcctttt ttctgcgcgt aatctgctgc 2820
 ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtgggttgg tgccgatca agagctacca 2880
 actcttttc cgaaggttaac tggcttcagc agagcgcaga taccaataat tggtctcta 2940
 gtgttagccgt agttagggcca ccacttcaag aactctgttag caccgcctac atacctcgct 3000
 20 ctgctaattc tggtaaccatggctgatcgcc agtggcgata agtcgtgtt taccgggtt 3060
 gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggcgg gctgaacggg gggttcgtgc 3120
 acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gataacctaca gcgtgagctt 3180
 tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcgacca ggtatccggt aagcggcagg 3240
 gtcggAACAG gagagcgcac gaggggagctt ccaggggggaa acgcctggta tctttatagt 3300
 cctgtcggtt ttcgcccaccccttgcactgttag cgtcgatttt tggatgttgc gtcagggggg 3360
 25 cggagcctat gggaaaaacgc cagcaacgcg gcttttttac gtttcgtggc cttttgtgg 3420
 ccttttgc acatgttctt tccctgcgtt tccctgtatt ctgtgatataa ccgtattacc 3480
 gcctttagt gagctgatcc cgctcgccgc acccgaaacga ccgagcgcag cgagtcagtg 3540
 agcgaggaaag cggaaagagcg cccaaatacgc aaaccgcctc tccccgcgc tggtccgatt 3600
 cattaatgca gctggcacga cagggttccc gactggaaag cgggcgttgc ggcgaacgc 3660
 30 attaatgtga gtagctcac tcattaggca ccccaaggctt tacactttat gttccgggt 3720
 cgtatgttgc ttggaatttgt gaggcgatataa caatttcaca caggaaacag ctatgaccat 3780
 gattacaat tcccatgcctt cgaggatataat gatataatgtt gttttatgtat 3840
 atatggaaagg ttccatggaa aaaaaggatcc tagaaacttcc caaaaaaaaat ccagaatata 3900
 ttttggaaaga aataccctct tgggttggcc cccggcgaccc ccctagtggg caaaaaaaaagcc 3960
 35 acgatctaattt cccggctctaa ttggcttaat agtttagact tctaatttgc cgggctctta 4020
 tgccggctctaa attggcttaat ttagattaaa atcctaattt aatataaagc caacttaggct 4080
 tccccctctct ctatgtttctt cggagcttcc ttcatggac cttgaatgtt tgccggatca 4140
 ctacttcggaa actcgtggat acttcagatgc gcatatcttcat gatggatctt gattggatg 4200
 tcatcttcggaa gaaatttcata cagttggggat gataaccagg ttgccatgttgc 4260
 40 cactcacagc caggatcagc ccatgtccca aggcaaccct tggatgtaca tgccgaggcc 4320
 tgactacttg gggcctcgcc ccctgcattt ttcatgttgc atgtgacacg taaaatgtt 4380
 agagaaatag attactaaat atcaccatc tggatgttgc agatgatgtt cttacaatatt 4440
 gtataccggaa aaatgttattt taaactgtgg taggtggaaa agatgttataaaaacttc 4500
 tacgtataact ccccccctccaa aatccccatc cagggttgc agacattttgc tttttttt 4560
 45 gccgaaatttt aaccgttaat ttgacttagta aaaataatgtt atactgaatg taataaataat 4620
 cgtacatccg gatgttggag acaggagag gttggctggc ggcgtggatg gatcagggtc 4680
 agaaagtctg acttgcacac ccacaggccc gttgattggc actgacaacc aagtttctgt 4740
 tgtttcgtgt gtgccatatt ttccgcgttgc gatataatataa actgcgtggaa gaaaggcaag 4800
 cagggcgcca tatcagcact tgatcactca ctgatcgatc agtagtagcc accttctctg 4860
 50 cggccgacgtg ttatataat tggcaacaa gtcatcgatc gagaacacaa aaaaaacaaag 4920
 aagagaacta ttggagagag agtagttac ccgcgcgcg tagctccca tttctgacca 4980
 tcatggccata cgataaaaccc gcccggcgccg agaccgttgc gcaagggttgc aatgccaaca 5040
 catgtcgccgc tcattttctcg gtttttcat ttgcatgtc gtcatgcagg ccctggacac 5100
 tgacattttctt ctctttgtt gttgaatgaa gaccctaaacc ttccaccatc agcacgcccc 5160
 55 tcaacttgc aaccgttagac gaaacccata tgcattgttgc atgagtaatg gtgtgcacga 5220
 atattatgaa cccgtttcca agagcaatac tccattggaa tacacccttctt ccttgcattct 5280
 gttcgttgcgtt cccatatttcca tagcggccgg cagttggccgt gactctgtact gccacgcaag 5340
 taatataatct ttaataaaactt cgtggcttgc ttctgtgtt ccatttgc gaaaggccaa atgcgtcag 5400
 tgacgatgttgc cccatgcata gcttaatttgc tccatgttgc ccactgcttc cattaaatccc 5460
 60 ctatataaag gactccatatt gcttcaccat tcactcatcc accacagttt accagcagca 5520
 acaaccaggatc ccatagacac tctccatcaa caaactctatc ctgatcaatc ttagctaaac 5580
 ttattacata gcaagcccc 5598

65 <210> 36
 <211> 12776
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

70 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: recombinant
 expression vector pLo1140XoBI-1

<400> 36

aattcaactgg ccgtcgaaaa acaacgactc agagcttgcaggaggccccg atcttagtaac 60
 atagatgaca ccgcgcgcga taatttatcc tagtttgcgc gctatatttt gttttctatc 120
 5 gcgttataaa tgataatttgcggactcta atcataaaaaa cccatctcat aaataacgtc 180
 atgcattaca ttttattat tacatgttta acgttaattca acagaaatta tatgataatc 240
 atcgcacagac cggcaacagg attcaatctt aagaaacttt attgccaat gtttgcacga 300
 tcggggatca tccgggtctg tggcggaac tcacgaaaa tatccgaacg cagcaagatc 360
 tagagttgg gtccccgtca gaagaactcg tcaagaaggc gatagaaggc gatgcgctgc 420
 10 gaatcgggag cggcgatacc gtaaaagcagc agaaggcggt cagcccatc gccgccaagc 480
 tcttcagcaa tttcacgggt agccaaacgt atgtcctgtt agcgggtccgc cacacccagg 540
 cggccacagt cgatgaatcc agaaaaggcgg ccattttccca ccatgatatt cggcaagcag 600
 gcatcgccat ggttcacgac gagatcctcg cctgcggca tgcgcgcctt gaggctggcg 660
 aacagttcg gttggcgcag cccctgtatgc ttctcgatcca gatcatcctg atcgacaaga 720
 15 cccgcttcca tccgagtagc tgctcgatcg atgcgtatgtt tgcgttggg gtcgaatggg 780
 caggtagccg gatcaagcgt atgcagccgc cgcattgtcat cagccatgtat ggataactt 840
 tcggcaggag caaggtgaga tgacaggaga tcctgccccg gcacttcgcg caatagcagc 900
 cagtccttc cccgttcgtat gacaacgtcg agcacatcg cgcgaaggAAC gcccgtcg 960
 gccagccacg atagccgcgc tgcctcgatc tgcgttcat tgcaggcacc gcacaggctg 1020
 gtcttgacaa aaaaacccggc ggcggccctgc gtcgacagcc ggaacacggc ggcacatcagag 1080
 20 cagccgattt tctgttgtgc ccagtcatag cccaaatagcc tctccaccca agcggccgg 1140
 gaacctgcgt gcaatccatc ttgttcaatc atgcgaaacg atccagatcc ggtgcagatt 1200
 atttggattt agagtgaata tgagactcta attggatacc gagggaattt tatggaacgt 1260
 cagtggagca tttttgacaa gaaatatttgc ttagtgcata tgcgttcat tgcgtttag ggcacttt 1320
 25 aacgcgcata aatggtttc gacgtatgtt cttagtgcata taaactccat aaaaacccgg 1380
 ctgagttggc ctttcaacgt tgcgggtctg tgcgttccaa acgtttaaaacg gcttgcggc 1440
 cgtcatcgcc ggggttcata acgtgactcc cttatttc cgcattgtat cagattgtc 1500
 tttcccgctt tcaagtttataa cttatgtgt ttgcaggat cctgcgttgcg aataattgtc 1560
 attagattgt tttatgcata agatgcactc gaaatcggcc aatttttagac aagtatcaa 1620
 30 cggatgttaa ttcaagtatcat taaagacgtc cgcattgtgt tattaaatgtt tctaagcgtc 1680
 aatttggtaa caccacaata tttccgtcca ccagccagcc aacagtcccc cgaccggcag 1740
 ctcggcacaa aatcaccacg ctttaccacc accggccggc gccgcattgtt gttgaccgt 1800
 ttccggcgc tttccggat tgcgttcc cttatgtgtt cttatgtatc accgcaccccg gaggccggc 1860
 gaggccgcgc accggccggg ctttccgtt ggcccccggc ttaccctcac cccggcacag 1920
 atcgcgcacg ccccgcgagct gatcgaccatc gaaaggccgcg cctgtaaaga ggcggctgca 1980
 35 ctgcttggcg tgcattgtctt gaccctgtac cgcgcacttgc agcgcagcga ggaagtgcg 2040
 cccaccggagg ccaggccggc ctttccgtt ctttccgttgcg ctttccgttgcg ctttccgttgcg 2100
 ctggccggccg cccggatgtt ctttccgttgcg ctttccgttgcg ctttccgttgcg ctttccgttgcg 2160
 aggacgaacc gtttttccat ctttccgttgcg ctttccgttgcg ctttccgttgcg ctttccgttgcg 2220
 tttccgttgcg ctttccgttgcg ctttccgttgcg ctttccgttgcg ctttccgttgcg ctttccgttgcg 2280
 40 ctgatgcca gctggccgc tttccgttgcg ctttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 2340
 gtctaaaaaaat gttttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 2400
 tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 2460
 taaccagaaa ggcgggttcag gcaagacgcac catcgcaacc catcgatccc gtcgttgcg 2520
 45 actccggccgg ggcgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 2580
 ggcggccgtt gggggatgtt aaccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 2640
 cccgcgttgcg aaccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 2700
 ggcggacttt gttttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 2760
 aagcccttac gacatatggg ccaccggccgc ctttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 2820
 50 ggttccgttgcg gttttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 2880
 catcgccgtt gggggatgtt aaccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 2940
 tatcgcgcacg cccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 3000
 agaaccggcg ggcgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 3060
 actcatttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 3120
 55 ggcgttgcg ggcgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 3180
 ggcgttgcg ggcgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 3240
 ggcgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 3300
 ggcgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 3360
 ggcgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 3420
 60 ggcgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 3480
 caagcccgag gttttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 3540
 ggcgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 3600
 atcgcggccg gttttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 3660
 65 ggcgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 3720
 ggcgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 3780
 atcatggacg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 3840
 cgcgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 3900
 gtgtgggattt acggatcttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 3960
 tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 4020
 70 ctcaagtttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 4080
 attcgggtttac accaccacgcg ctttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 4140
 ctgggtacgg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 4200
 accggccggc cggactatcg ctttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 4260
 gaaggcaaga accccggacgt gttttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg tttccgttgcg 4320

	atcggccgtt	ttctctaccg	cctggcacgc	cgcgccgcag	gcaaggcaga	agccagatgg	4380
5	ttgttcaaga	cgatctacga	acgcagtggc	agcgccggag	agttcaagaa	gttctgtttc	4440
	accgtgcgca	agctgatcg	gtcaaattgac	ctgcccggagt	acgattttgaa	ggaggaggcg	4500
	ggcaggctg	gccccatct	agtcatgcgc	taccgcaacc	tgatcgaggg	cgaagcatcc	4560
	gccggttcct	aatgtacgga	gcagatgcta	ggcaatttg	ccctagcagg	ggaaaaaggt	4620
	cgaaaaggtc	tctttctgt	ggatagcaeg	tacattggga	acccaaaggc	gtacattggg	4680
10	aaccggaaac	cgtacattgg	gaacccaag	ccgtacattt	gaaacgggtc	acacatgtaa	4740
	gtactgata	taaaagagaa	aaaaggcgat	ttttccgcct	aaaactctt	aaaacttatt	4800
	aaaactctta	aaacccgcct	ggcctgtgca	taactgtctg	gccagcgcac	agccgaagag	4860
	ctgcaaaaag	cgcctaccct	tcggtcgctg	cgctccctac	gccccggccg	ttcgcgtcgg	4920
	cctatcgccg	ccgctggccg	ctcaaaaatg	gctggcttac	ggccaggcaa	tctaccaggg	4980
15	cgcggacaag	ccgcggcgtc	gccactcgac	cgccggcgcc	cacatcaagg	caccctgcct	5040
	cgcgcgtttc	ggtgatgacg	gtgaaaacat	ctgacacatg	cagttccccc	agacggtcac	5100
	agcttgtctg	taaggcgat	ccgggagcag	acaageccgt	cagggcgggt	caggggtgt	5160
	tggccgtgt	cggggcgcag	ccatgacca	gtcacatgc	gatagcggag	tgtatactgg	5220
	cttaactatg	cggcatcaga	gcgaggatgt	ctgagagtgc	acatatgtcg	gtgtgaaata	5280
	ccgcacagat	gctgtaaggag	aaaataccgc	atcaggcgct	cttccgcttc	ctcgctact	5340
	gactcgctgc	gctcgctgt	tcggctgccc	cgagcggtat	cagctcactc	aaaggcggta	5400
20	atacggttat	ccacagaatc	aggggataac	gcagggaaaga	acatgtgagc	aaaaggccag	5460
	caaaggcaca	ggaaccgtaa	aaaggccgcg	ttgtggcg	ttttccatag	gctccgcccc	5520
	cctgacgagc	atcacaaaaa	tcgacgctca	agtcagaggt	ggcggaaaccc	gacaggacta	5580
	taaagatacc	aggcgttcc	cccttggaa	tccctcg	gtctcttgc	tccgaccctg	5640
	ccgcttaccg	gatacctg	ccgccttctc	ccttcggaa	gctgtggcg	ttctcatagc	5700
25	tcacgctgt	ggtatctcg	ttcggtgtag	gtcggtcg	ccaagctggg	ctgtgtgcac	5760
	gaacccccc	ttcagccga	ccgctgcgc	ttatccgt	actatcg	tgagtccaa	5820
	ccggtaagac	acgacttac	gccactggc	gcagccactg	gtaacaggat	tagcagagcg	5880
	agttatgtag	gctgtgtac	agagttctg	aagtgg	ctaactacgg	ctacactaga	5940
	aggacagttat	ttgttatctg	cgctctgt	aaggcagtt	cettccggaa	aaagatgtgt	6000
	agctcttgc	ccggccaaaca	aaccaccgt	ggtagcgg	gtttttgt	ttgcaagcag	6060
30	cagattacgc	gcagaaaaaa	aggatctcaa	gaagatcctt	tgatctttc	tacggggct	6120
	gacgctcagt	ggaacgaaaa	ctcacgtt	gggattttgg	tcatgcata	tatactccc	6180
	aatttgtgt	ggcatttatta	tgcacgctt	aaaataataa	aagcagactt	gacctgatag	6240
	tttggctgt	agcaattatg	tgcttagtgc	atctaaccgt	tgagttaa	cgccgcgcga	6300
	agccgcgtcg	gcttgaacga	atttctagct	agacattatt	tgccgcactac	cttgggtatc	6360
35	tcgccttca	cgtatggac	aaatttctcc	aactgtatcg	cgccgcggc	caagcgatct	6420
	tettctgtc	caagataagc	ctgtatcg	tcaatgtat	cggtcgat	ctggccggc	6480
	aggcgctcca	ttgcccagtc	ggcagcgcaca	tccttcggcg	cgattttgc	ggttactcg	6540
	ctgtacccaa	tgccggacaa	cgtaagcact	acatttcgt	catcgccagc	ccagtcgggc	6600
	ggcgagttcc	atagcgtaa	ggtttcattt	agcgcctcaa	atagatctg	ttcaggaacc	6660
40	ggatcaaaga	gttcctccgc	cgctggact	accaaggc	cgctatgtt	tctgtcttt	6720
	gtcagcaaga	tagccagatc	aatgtcgatc	gtggctgtt	cgaagatacc	tgcaagaatg	6780
	tcattcgct	gcccatttcc	aaattgtca	tcggcgtttag	ctggataacg	ccacggatg	6840
	atgtcgctg	gcacaaataat	ggtgtactt	acagcgcgg	gaatctcg	ctctccagg	6900
	gaagccgaag	tttccaaaag	tgctgtatc	aaagtcgccc	ggtgtttc	atcaaggcctt	6960
45	acggtcaccc	taaccagcaa	atcaatatac	ctgtgtggct	tcagggcc	atccactcg	7020
	gagccgtaca	aatgtacg	cagcaacgtc	ggttgcagat	ggcgctcgat	gacgccaact	7080
	acctctgata	gttgagtcg	tacttcggcg	atcaccgtt	ccccatcgat	gtttaacttt	7140
	gttttagggc	gactgcctgc	ctgcgtaa	tcgtgtgtc	tccctatgt	ttacgatcg	7200
	cccacggcg	aacgcgttgc	ctgttggat	gcccggaggca	tagactgtac	ccccaaaaaa	7260
50	cagtataac	aaacccatgaa	aaccgcact	gcgggggtt	catggacata	caaatggacg	7320
	aacggataaa	ccttttacg	ccctttttaaa	tatccgatta	ttctaataaa	cgctctttt	7380
	tcttaggtt	acccgccaat	atatccgtc	aaacactgtat	agtttaact	gaaggcggga	7440
	aacgacaatc	agatcttagt	ggaaacagct	atgaccatga	ttacgccaag	cttgcatgc	7500
55	tgcagggtcg	ctctagagg	tcgtatcccg	ggttaggtc	tccctatgt	tacgtctgt	7560
	agaaacccca	acccgtaaa	tcaaaaaact	cgacggccgt	tgggcattca	gtctggatcg	7620
	cgaaaactgt	ggaatttggc	agcgttgg	ggaaagcgc	ttacaagaaa	gcccggcaat	7680
	tgctgtgc	ggcagtttta	agcatcgat	cgccgtatc	gatattcgta	attatgcggg	7740
	caacgtctgg	tatcagcgc	aagtctttat	accgaaaaggt	tgggcaggcc	agctgtatcg	7800
60	gctgcgtt	gatgcgg	ctcattacgg	caaagtgtgg	gtcaataatc	aggaagtgtat	7860
	ggagcatcg	ggcgctata	cgccatttga	agccgtatgc	acgcccgtat	ttattgcgg	7920
	aaaaagtgt	cgtaagt	tgcttctacc	tttgatata	ataataataat	tatcattaaat	7980
	tagtagtaat	ataatatttc	aaatatttt	ttcaaaaataa	aagaatgtat	tatatacgaa	8040
	ttgtttttct	gttagttata	agtgtgtata	ttttat	taactttct	aatatatgtac	8100
	aaaaatttgc	tgatgtgcag	gtatcacgt	ttgtgtgaac	aacgaactga	actggcagac	8160
65	tatccgc	ggaatggtga	tatccgacga	aaacggcaag	aaaaagcagt	tttacttcca	8220
	tgatttctt	aactatgc	gaatccatcg	cagcgtat	ctctacacca	cgccgaacac	8280
	ctgggtggac	gatatcacc	tggtgcac	tgtcgcgc	gactgtatc	acgcgtctgt	8340
	tgactggc	gtggggc	atgggtatgt	cagcgttgg	ctgcgtat	cggtatcaaca	8400
	ggtgggttgc	actggacaag	gacttagcgg	gactttggca	gtgggtgaatc	cgcacctcg	8460
70	gcaacccgg	gaaggttac	tctatgtact	gtgcgtcaca	gccaaaagcc	agacagatgt	8520
	tgatataacc	ccgcttcgc	tcggcatcc	tgctgtggca	gtgaaggcgc	aacagtcc	8580
	gattaaccac	aaacccgtt	actttactgg	cttgggtcg	catgaagat	cggacttgc	8640
	tggcaaaagg	ttcgataac	tgctgtatgt	gcacgaccac	gcattaatgg	actggatttg	8700

ggc当地actcc taccgtacct cgc当地atccc ttacgctgaa gagatgctcg actggcaga 8760
 tgaacatggc atcgtggta ttgatgaaac tgctgctgc ggcttaacc tctctttagg 8820
 cattggtttc gaagcggca acaaggcga agaactgtac agegaagagg cagtcaacgg 8880
 5 gaaaactcg caagcgcact tacaggcgat taagagctg atagcgcgtg aaaaaaacca 8940
 cccaagcgtg gtatgtgga gtatggca cgaaccggat acccgccgc aaggtaacg 9000
 ggaatatttc ggc当地actgg cgaaagcaac gcgtaaactc gacccgacgc gtccgatcac 9060
 ctgc当地aat gtaatgttct ggc当地actca caccgatacc atcagcgatc tctttatgt 9120
 gctgtgcctg aaccgttatt acggatggta tgc当地aaagc ggc当地ttgg aaacggcaga 9180
 10 gaaggtaactg gaaaaagaac ttctggctg gcaggagaaa ctgcatcagc cgattatcat 9240
 caccgaatac ggc当地ggata cgtagccgg gtc当地actca atgtacaccg acatgtggag 9300
 tgaagatgat cagtgtcat ggctgatgat gtatccgcg gtcttgcgat gcgtcagcgc 9360
 cgtc当地cggt gaaacggatgat ggaatattcgat cgatattcgat acctc当地aaag gcatattgcg 9420
 cgttggcggt aacaagaaag ggc当地ttcactc tgc当地accgcg aaaccgaagt cggc当地ctt 9480
 tctgctgaa aacacgtggc ctggcatgaa ct当地ggtaaaacccgcgagc agggaggcga 9540
 15 acaatgagag ctc当地atttc cccgatcgtg ccaaaccatggat gcaataaaagn ttcttaagat 9600
 tgaatccgtg tgc当地gtctt ggc当地atgatcataatt tctgttgaat tgc当地taagc 9660
 atgtaataat taacatgtg tgc当地atgatcataattttagat atggggtttt atgatttagag 9720
 tcccgcaatt atacatttaa tacgc当地atgatcataatccatgcgca aactaggata 9780
 aattatcgcg cggc当地gtgtca tctatgttac tagatcggga attccatgc ctc当地gagcga 9840
 20 aagatataat atgtaaaaaa atgggtctat atatatggaa ggttccagga agacaaaagg 9900
 tctagaaaact tc当地aaaaaaa atccagaata tattttggaa gaaataccctt cttggggttgg 9960
 cccc当地ggcga gccc当地tagtg ggcc当地aaag ccacgatcta atccgggtctt aattgggtcta 10020
 atagtttaga ct当地taattt gacgggctct tatggccgtc taattttgtctt aatttagat 10080
 aaatccatataat taatatggaa cgc当地actggat cttcccccctt ctctatgtt ctc当地ggatctc 10140
 25 ttttgc当地atgg accttgc当地atggat attggccgat cactacttgc gaaactcgtgg atacttcaga 10200
 gtgc当地atctt accttgc当地atggat ttgatgttgc gatcatctcg gagaatttctt cacagttggg 10260
 aggtataacc agttggcgaat ttgc当地atgtc ttcaactcaca gccaggatca gccc当地gtcc 10320
 caaggcaacc ct当地tagtca catgccc当地ggggatc tggggccctcg cggc当地ctgc当地 10380
 ttttgc当地atgtt ctatgtgaca ct当地ggatgt tgagagaaaat agattactaa atatcacc 10440
 30 tttc当地gtt ctatgtgact atccatcataat atgtatcactcg aaaaatgtat tt当地aaactgt 10500
 ggttaggtgaa aaaaatgtat taaaatggaaat tctatgtataat cttcccccctt ccaatccccca 10560
 tccaggatggta taagacactt tgc当地ttttt tgc当地ccattt ttaaccgtaa atttgc当地at 10620
 taaaatataat ttatactgaa tgc当地atataat atcgtatcattt cggatgttgg agacaggagg 10680
 aggctggctg gtgc当地gtggc tggatcaccgg tcaagaaatgc tgacttgc当地 cggccacaggc 10740
 35 cc当地tttgc当地atggc ccactgacaaa ccaatggatc gttgttgc当地 tggtgc当地ataat tttccgc当地 10800
 tc当地atattt aaactgc当地gg gagaatggca agcaggccgc catatcagca ct当地gtact 10860
 cactatcgatc tcaatgtatggat ccaccccttc tgc当地ccggatc tggatataat tattggcaac 10920
 aagtcatcgatc ttgagaaatggc aaaaatggaaat agaagagaaat tatttgc当地 agatgtat 10980
 cggccgagcg agtgc当地cttcc catttctgc当地 gatcatgc当地 tacgataaaac cggccggccgg 11040
 40 cgagaccatgt tagcaaggtt gaaatggcaat cacaatgtcg gtc当地atttctt cggcc当地tttc 11100
 attttgc当地atgtg tc当地atgtca gggccatggc actgacatattt ctcttctttt ct当地gtatg 11160
 aagaccctaa ct当地ttccatca tc当地acgc当地 cctcaacttgc ataagcctatc acgaaaacc 11220
 tatgc当地atgtatgtatgatgatc ttgatgtgatc gatattatggat aaccgc当地tcc caagagcaat 11280
 actccatgtgatc gatacaccctt ct当地atgtatgtatc ttgatgtgatc gatcatgc当地 tacgatggcc 11340
 45 ggc当地atggcc ttgatgtgatc ct当地atgtatgtatc gatcatgc当地 agtgc当地atgc当地 tggccatcc 11400
 tgc当地atgtatgtatc gtccatatttgc aatgc当地atgc当地 agtgc当地atgc当地 tgc当地atgc当地 11460
 agtccatgc atccactgtatc tccatatttgc cc当地atataatc aggactccat atgc当地atgc当地 11520
 attcactcat ccaccatcacttgcatccatgc当地 agtgc当地atgc当地 tgc当地atgc当地 11580
 aacaactctt agtgc当地atgtatc ttatgtatgtatc gatcatgc当地 tacgatggcc 11640
 tagatgtatgtatc ct当地atgtatgtatc gatcatgc当地 agtgc当地atgc当地 tgc当地atgc当地 11700
 50 cgagggacat tgc当地atgtatgtatc gatcatgc当地 agtgc当地atgc当地 tgc当地atgc当地 11760
 caggccgagg gatggccatgc ttctatgtatc tgc当地atgtatgtatc gatcatgc当地 agtgc当地atgc当地 11820
 acgactccctt caagaacttgc cggccatgc当地 cc当地atataatc gatcatgc当地 agtgc当地atgc当地 11880
 tttactgtatc tctatgtatgtatc gatcatgc当地 agtgc当地atgc当地 tgc当地atgc当地 11940
 55 cc当地atgtatgtatc cggccatgc当地 agtgc当地atgc当地 tgc当地atgc当地 12000
 tctc当地atgtatgtatc agtgc当地atgtatgtatc gatcatgc当地 agtgc当地atgc当地 tgc当地atgc当地 12060
 tggatggggatc ttctatgtatgtatc gatcatgc当地 agtgc当地atgc当地 tgc当地atgc当地 12120
 tctatgtatgtatc gatcatgc当地 agtgc当地atgc当地 tgc当地atgc当地 12180
 60 tgc当地atgtatgtatc gatcatgc当地 agtgc当地atgc当地 tgc当地atgc当地 12240
 tgctctggatc gatcatgc当地 agtgc当地atgc当地 tgc当地atgc当地 12300
 aggttactt tggatggggatc atcttcttgc当地 gatcatgc当地 agtgc当地atgc当地 tgc当地atgc当地 12360
 tgc当地atgtatgtatc gatcatgc当地 agtgc当地atgc当地 tgc当地atgc当地 12420
 acttggatc gatcatgc当地 agtgc当地atgc当地 tgc当地atgc当地 12480
 65 cggaggacaa gaagaagagg aagagggggatc tgc当地atgtatgtatc gatcatgc当地 agtgc当地atgc当地 12540
 cgtccatccatgc tgc当地atgtatgtatc gatcatgc当地 agtgc当地atgc当地 tgc当地atgc当地 12600
 atctctatgtatc taataatgtatc tgc当地atgtatgtatc gatcatgc当地 agtgc当地atgc当地 12660
 tttc当地atgtatgtatc gatcatgc当地 agtgc当地atgc当地 tgc当地atgc当地 12720
 ttctatgtatgtatc aaaatatttgc当地 attcttgc当地 cccatccatgc当地 agtgc当地atgc当地 12776

<213> Triticum aestivum

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)..(741)

<223> coding for TaBI-1

<400> 37

10	atg gac gcc ttc tac tcg acc tcg tcg gcg gcg gcg agc ggc tgg ggc Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ser Gly Trp Gly 1 5 10 15	48
15	tac gac tcc ctc aag aac ttc cgc gag atc tcc ccc gcc gtg cag tcc Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Glu Ile Ser Pro Ala Val Gln Ser 20 25 30	96
20	cac ctc aag ctc gtt tac ctg acc cta tgc ttt gcc ctg gcc tca tct His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Phe Ala Leu Ala Ser Ser 35 40 45	144
25	gcc gtg ggt gct tac ctg cac att gcc ctg aac atc ggt ggg atg ctg Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu 50 55 60	192
30	aca atg ctc gcg tgt gtt gga acc atc gcc tgg atg ttc tct gtg cca Thr Met Leu Ala Cys Val Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro 65 70 75 80	240
35	gtc tat gag gag agg aag agg ttt ggg ctg ctg atg ggt gca gcc ctc Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu 85 90 95	288
40	ctg gaa ggg gct tcg gtt gga cct ctg att gag ctt gcc ata gac ttt Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe 100 105 110	336
45	gac cca agt atc ctc gtg aca ggg ttt gtc gga acc gcc atc gcc ttc Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe 115 120 125	384
50	ggg tgc ttc tct ggc gcc gcc atc atc gcc aag cgc agg gag tac ctg Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu 130 135 140	432
55	tac ctc ggt ggt ctg ctc tcc ggc ctg tcg atc ctg ctc tgg ctg Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu 145 150 155 160	480
60	cag ttt gcc acg tcc atc ttt ggc cac tcc tct ggc agc ttc atg ttt Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe 165 170 175	528
65	gag gtt tac ttt ggc ctg ttg atc ttc ctg gga tac atg gtg tac gac Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp 180 185 190	576
70	acg cag gag atc atc gag agg gcg cac cac ggc gac atg gat tac atc Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile 195 200 205	624
75	aag cac gcg ctc acc ctc ttc acc gac ttc gtc gcc gtt ctc gtc cgc Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg 210 215 220	672
80	gtc ctc atc atc atg ctc aag aac gca ggc gac aag tcg gag gac aag Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys 225 230 235 240	720
85	aag aag agg aag agg ggg tcc tga	744
90	Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser 245	

<210> 38
 <211> 247
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

5 <400> 38
 Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ser Gly Trp Gly
 1 5 10 15
 10 Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Glu Ile Ser Pro Ala Val Gln Ser
 20 25 30
 His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Phe Ala Leu Ala Ser Ser
 35 40 45
 15 Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu
 50 55 60
 20 Thr Met Leu Ala Cys Val Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro
 65 70 75 80
 Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu
 85 90 95
 25 Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe
 100 105 110
 Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe
 115 120 125
 30 Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu
 130 135 140
 35 Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu
 145 150 155 160
 Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe
 165 170 175
 40 Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp
 180 185 190
 Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile
 195 200 205
 45 Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg
 210 215 220
 50 Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys
 225 230 235 240
 Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser
 245

55
 <210> 39
 <211> 1293
 <212> DNA
 60 <213> Hordeum vulgare

<220>
 <221> CDS
 <222> (173)...(1126)
 65 <223> coding for Hordeum vulgare subsp. vulgare syntaxin
 (Ror2)
 <400> 39
 gtaactaacc ccttcttcct cccttgtcca ctccgcttct ccccatccaa gaaacagcgc 60
 70 caacagctcc acccatcgag gagaatcaag aaaccgcgcc ggcgtggta tcaaggacat 120
 ccatcgatcg atcgaccgac cctgccttgc ctgagtcaac cggcggcag cc atg aac 178

Met Asn
1

	aac ctc ttc tcg agc tcg tgg aag cgg gcg ggc gcg ggg ggc gac ggg	226
5	Asn Leu Phe Ser Ser Ser Trp Lys Arg Ala Gly Ala Gly Gly Asp Gly	
	5 10 15	
	gac ctg gag tcg ggc ggc ggc gtg gag atg acg gcg ccg ccg ggc	274
10	Asp Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Glu Met Thr Ala Pro Pro Gly	
	20 25 30	
	gcc gcg gcg ggg gcg agc ctg gac cgc ttc ttc gag gac gtg gag tcg	322
	Ala Ala Ala Gly Ala Ser Leu Asp Arg Phe Phe Glu Asp Val Glu Ser	
15	35 40 45 50	
	atc aag gac gac ctg cgg gag ctg gag cgg atc cag cgc tcc ctc cac	370
	Ile Lys Asp Asp Leu Arg Glu Leu Glu Arg Ile Gln Arg Ser Leu His	
	55 60 65	
20	gac ggc aac gag tcg ggc aag tcg ctc cac gac gcg tcg gcg gtg cgc	418
	Asp Gly Asn Glu Ser Gly Lys Ser Leu His Asp Ala Ser Ala Val Arg	
	70 75 80	
25	gcg ctc cgc tcc cgc atg gac gcc gac gtg gcc gcc gcc atc aag aag	466
	Ala Leu Arg Ser Arg Met Asp Ala Asp Val Ala Ala Ile Lys Lys	
	85 90 95	
30	gcc aag gtg gtg aag ttg cgg ctc gag tcg ctc gac cgc gcc aac gcc	514
	Ala Lys Val Val Lys Leu Arg Leu Glu Ser Leu Asp Arg Ala Asn Ala	
	100 105 110	
35	gcc aac cgg tcc gtg gcc ggg tgc ggg cgg ggg tcg tcc acg gac cgc	562
	Ala Asn Arg Ser Val Ala Gly Cys Gly Pro Gly Ser Ser Thr Asp Arg	
	115 120 125 130	
	acc cgc acc tcc gtc gtg gcc ggg ctg cgc aag aag ctg cgg gat gcc	610
	Thr Arg Thr Ser Val Val Ala Gly Leu Arg Lys Lys Leu Arg Asp Ala	
	135 140 145	
40	atg gag tcc ttc tcc ctc cgc tcc cgc atc acc tcc gag tac cgg	658
	Met Glu Ser Phe Ser Ser Leu Arg Ser Arg Ile Thr Ser Glu Tyr Arg	
	150 155 160	
45	gaa acc gtg gcc cgc cgc tac ttc acg gtg acg ggg tcc cag ccc gac	706
	Glu Thr Val Ala Arg Arg Tyr Phe Thr Val Thr Gly Ser Gln Pro Asp	
	165 170 175	
50	gag gcc acg ctg gac acg ctg gcg gag acg ggg gag ggg gag cgg ctc	754
	Glu Ala Thr Leu Asp Thr Leu Ala Glu Thr Gly Glu Gly Glu Arg Leu	
	180 185 190	
55	ctg cag cgc gcc atc gcg gag cag cag ggg aga ggg gag gtg ctg ggc	802
	Leu Gln Arg Ala Ile Ala Glu Gln Gln Gly Arg Gly Glu Val Leu Gly	
	195 200 205 210	
	gtg gtg gcg gag atc cag gag cgg cac ggc gcc gtg gcg gac ctg gag	850
	Val Val Ala Glu Ile Gln Glu Arg His Gly Ala Val Ala Asp Leu Glu	
	215 220 225	
60	cgg tcc ctg ctg gag ctg cag cag gtg ttc aac gac atg gcc gtg ctg	898
	Arg Ser Leu Leu Glu Leu Gln Gln Val Phe Asn Asp Met Ala Val Leu	
	230 235 240	
65	gtg gcg gcg cag ggg gag cag ctg gac gac atc gag ggc cac gtc ggg	946
	Val Ala Ala Gln Gly Glu Gln Leu Asp Asp Ile Glu Gly His Val Gly	
	245 250 255	
70	cgg gcg agg tcg ttc gtc gac cgc ggg cgc gag cag ctg cag gtg gca	994
	Arg Ala Arg Ser Phe Val Asp Arg Gly Arg Glu Gln Leu Gln Val Ala	
	260 265 270	
	cgc aag cac cag aag agc tcc cgc aag tgg acc ttc atc ggc atc ggc	1042
	Arg Lys His Gln Lys Ser Ser Arg Lys Trp Thr Phe Ile Gly Ile Gly	

37

	275	280	285	290	
	atc ctg ctc gtc atc ctc atc atc gtc atc ccc atc gtg ctc aag Ile Leu Leu Val Val Ile Leu Ile Val Ile Pro Ile Val Leu Lys				1090
5	295		300	305	
	aac acc aac aag agc aac aac aac agc cag cag tagtggtagg Asn Thr Asn Lys Ser Asn Asn Asn Ser Gln Gln				1136
	310		315		
10	aacagcctgt ggatctgttg tctgtctctg atgatccctgg tcctggattt cttcctggtt				1196
	gttgggttg attgtctttt gtggaaatttt ttgcgattgt aattactcca tccatgtgg				1256
15	tcgttgagcc actcgattat tatttcatga ctatata				1293
	<210> 40				
20	<211> 318				
	<212> PRT				
	<213> Hordeum vulgare				
	<400> 40				
25	Met Asn Asn Leu Phe Ser Ser Trp Lys Arg Ala Gly Ala Gly 1 5 10 15				
	Asp Gly Asp Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Glu Met Thr Ala Pro 20 25 30				
30	Pro Gly Ala Ala Ala Gly Ala Ser Leu Asp Arg Phe Phe Glu Asp Val 35 40 45				
	Glu Ser Ile Lys Asp Asp Leu Arg Glu Leu Glu Arg Ile Gln Arg Ser 50 55 60				
35	Leu His Asp Gly Asn Glu Ser Gly Lys Ser Leu His Asp Ala Ser Ala 65 70 75 80				
40	Val Arg Ala Leu Arg Ser Arg Met Asp Ala Asp Val Ala Ala Ala Ile 85 90 95				
	Lys Lys Ala Lys Val Val Lys Leu Arg Leu Glu Ser Leu Asp Arg Ala 100 105 110				
45	Asn Ala Ala Asn Arg Ser Val Ala Gly Cys Gly Pro Gly Ser Ser Thr 115 120 125				
	Asp Arg Thr Arg Thr Ser Val Val Ala Gly Leu Arg Lys Lys Leu Arg 130 135 140				
50	Asp Ala Met Glu Ser Phe Ser Ser Leu Arg Ser Arg Ile Thr Ser Glu 145 150 155 160				
	Tyr Arg Glu Thr Val Ala Arg Arg Tyr Phe Thr Val Thr Gly Ser Gln 165 170 175				
55	Pro Asp Glu Ala Thr Leu Asp Thr Leu Ala Glu Thr Gly Glu Gly Glu 180 185 190				
60	Arg Leu Leu Gln Arg Ala Ile Ala Glu Gln Gln Gly Arg Gly Glu Val 195 200 205				
	Leu Gly Val Val Ala Glu Ile Gln Glu Arg His Gly Ala Val Ala Asp 210 215 220				
65	Leu Glu Arg Ser Leu Leu Glu Leu Gln Gln Val Phe Asn Asp Met Ala 225 230 235 240				
	Val Leu Val Ala Ala Gln Gly Glu Gln Leu Asp Asp Ile Glu Gly His 245 250 255				
70	Val Gly Arg Ala Arg Ser Phe Val Asp Arg Gly Arg Glu Gln Leu Gln 260 265 270				

Val Ala Arg Lys His Gln Lys Ser Ser Arg Lys Trp Thr Phe Ile Gly
 275 280 285

5 Ile Gly Ile Leu Leu Val Val Ile Leu Ile Ile Val Ile Pro Ile Val
 290 295 300

Leu Lys Asn Thr Asn Lys Ser Asn Asn Asn Asn Ser Gln Gln
 305 310 315

10

<210> 41
 <211> 948
 15 <212> DNA
 <213> *Arabidopsis thaliana*

<220>
 <221> CDS
 20 <222> (1)...(945)
 <223> coding for *Arabidopsis thaliana* syntaxin 121
 (SYP121) / syntaxin-related protein (SYR1)
 (At3g11820)

25 <400> 41
 atg gcg aat ccc gcg gga tca acc ggt ggt gtg aac ctc gac aag ttc
 Met Ala Asn Pro Ala Gly Ser Thr Gly Gly Val Asn Leu Asp Lys Phe
 1 5 10 15

30 ttc gaa gat gtt gaa tct gtg aaa gaa gag cta aag gag cta gat cgg
 Phe Glu Asp Val Glu Ser Val Lys Glu Glu Leu Lys Glu Leu Asp Arg
 20 25 30

35 ctc aac gaa aca ctc tct tca tgt cac gag cag agc aag acg ctt cac
 Leu Asn Glu Thr Leu Ser Ser Cys His Glu Gln Ser Lys Thr Leu His
 35 40 45

40 aat gct aaa gcc gtt aaa gat ctc cgg tct aaa atg gac ggt gac gtt
 Asn Ala Lys Ala Val Lys Asp Leu Arg Ser Lys Met Asp Gly Asp Val
 50 55 60

45 gga gtc gcg ttg aag aag gcg aag atg att aaa gtt aaa ctc gag gcg
 Gly Val Ala Leu Lys Lys Ala Lys Met Ile Lys Val Lys Leu Glu Ala
 65 70 75 80

50 cta gat cgt gcc aat gct gct aat cgg agt ctc cct ggc tgt gga cct
 Leu Asp Arg Ala Asn Ala Ala Asn Arg Ser Leu Pro Gly Cys Gly Pro
 85 90 95

55 ggt tct tcc tcc gat cga acc agg acc tct gtc ctc aat ggt ctc agg
 Gly Ser Ser Asp Arg Thr Arg Thr Ser Val Leu Asn Gly Leu Arg
 100 105 110

60 aag aaa ttg atg gac tct atg gat agt ttc aac cga ttg agg gag ctt
 Lys Lys Leu Met Asp Ser Met Asp Ser Phe Asn Arg Leu Arg Glu Leu
 115 120 125

65 atc tcg tcc gag tat aga gaa act gta cag agg agg tac ttc acc gtc
 Ile Ser Ser Glu Tyr Arg Glu Thr Val Gln Arg Arg Tyr Phe Thr Val
 130 135 140

70 acc ggc gag aat ccg gat gaa cga acc cta gat cga ctg att tcc act
 Thr Gly Glu Asn Pro Asp Glu Arg Thr Leu Asp Arg Leu Ile Ser Thr
 145 150 155 160

75 gga gag agt gag aga ttc ttg cag aaa gca ata caa gaa caa gga aga
 Gly Glu Ser Glu Arg Phe Leu Gln Lys Ala Ile Gln Glu Gln Gly Arg
 165 170 175

80 gga agg gtg tta gac acc att aac gag att caa gaa agg cat gat gcg
 Gly Arg Val Leu Asp Thr Ile Asn Glu Ile Gln Glu Arg His Asp Ala
 180 185 190

48 96 144 192 240 288 336 384 432 480 528 576

gtt aaa gac att gag aag aat ctc agg gag ctt cac cag gtg ttt cta 624
 Val Lys Asp Ile Glu Lys Asn Leu Arg Glu Leu His Gln Val Phe Leu
 195 200 205

5 gac atg gcc gtg ctg gta gag cac cag gga gct ctt gat gac atc 672
 Asp Met Ala Val Leu Val Glu His Gln Gly Ala Gln Leu Asp Asp Ile
 210 215 220

10 gag agt cat gtg ggt cga gct agc tcc ttt atc aga ggc gga act gac 720
 Glu Ser His Val Gly Arg Ala Ser Ser Phe Ile Arg Gly Gly Thr Asp
 225 230 235 240

15 cag cta caa acc gct cgg gtt tac cag aag aac acg cga aaa tgg aca 768
 Gln Leu Gln Thr Ala Arg Val Tyr Gln Lys Asn Thr Arg Lys Trp Thr
 245 250 255

20 tgt att gcc att att ctc atc atc atc ata act gtt gtg gtt ctt 816
 Cys Ile Ala Ile Ile Leu Ile Ile Ile Ile Thr Val Val Val Leu
 260 265 270

25 gct gtt tta aaa ccg tgg aac aac agc agt ggc ggc ggc ggc ggt ggt 864
 Ala Val Leu Lys Pro Trp Asn Asn Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly
 275 280 285

30 cca aat cct cct cag gca agg cgt cta ttg cgt tga 948
 Pro Asn Pro Pro Gln Ala Arg Arg Leu Leu Arg
 305 310 315

35 <210> 42
 <211> 315
 <212> PRT
 <213> *Arabidopsis thaliana*

40 <400> 42
 Met Ala Asn Pro Ala Gly Ser Thr Gly Gly Val Asn Leu Asp Lys Phe
 1 5 10 15
 Phe Glu Asp Val Glu Ser Val Lys Glu Glu Leu Lys Glu Leu Asp Arg
 20 25 30

45 Leu Asn Glu Thr Leu Ser Ser Cys His Glu Gln Ser Lys Thr Leu His
 35 40 45

50 Asn Ala Lys Ala Val Lys Asp Leu Arg Ser Lys Met Asp Gly Asp Val
 50 55 60

Gly Val Ala Leu Lys Lys Ala Lys Met Ile Lys Val Lys Leu Glu Ala
 65 70 75 80

55 Leu Asp Arg Ala Asn Ala Ala Asn Arg Ser Leu Pro Gly Cys Gly Pro
 85 90 95

Gly Ser Ser Asp Arg Thr Arg Thr Ser Val Leu Asn Gly Leu Arg
 100 105 110

60 Lys Lys Leu Met Asp Ser Met Asp Ser Phe Asn Arg Leu Arg Glu Leu
 115 120 125

Ile Ser Ser Glu Tyr Arg Glu Thr Val Gln Arg Arg Tyr Phe Thr Val
 130 135 140

Thr Gly Glu Asn Pro Asp Glu Arg Thr Leu Asp Arg Leu Ile Ser Thr
 145 150 155 160

70 Gly Glu Ser Glu Arg Phe Leu Gln Lys Ala Ile Gln Glu Gln Gly Arg
 165 170 175

Gly Arg Val Leu Asp Thr Ile Asn Glu Ile Gln Glu Arg His Asp Ala

40

	180	185	190		
5	Val Lys Asp Ile Glu Lys Asn Leu Arg Glu Leu His Gln Val Phe Leu	195	200	205	
	Asp Met Ala Val Leu Val Glu His Gln Gly Ala Gln Leu Asp Asp Ile	210	215	220	
10	Glu Ser His Val Gly Arg Ala Ser Ser Phe Ile Arg Gly Gly Thr Asp	225	230	235	240
	Gln Leu Gln Thr Ala Arg Val Tyr Gln Lys Asn Thr Arg Lys Trp Thr	245	250	255	
15	Cys Ile Ala Ile Ile Leu Ile Ile Ile Ile Thr Val Val Val Leu	260	265	270	
20	Ala Val Leu Lys Pro Trp Asn Asn Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly	275	280	285	
	Gly Gly Gly Thr Thr Gly Gly Ser Gln Pro Asn Ser Gly Thr Pro	290	295	300	
25	Pro Asn Pro Pro Gln Ala Arg Arg Leu Leu Arg	305	310	315	

30	<210> 43 <211> 1275 <212> DNA <213> Hordeum vulgare
35	<220> <221> CDS <222> (80)..(1006) <223> coding for Hordeum vulgare subsp. vulgare SNAP-34
40	<400> 43 ggccccctcca ccccacccca cccagtcgct gcgataactt gattctgcta ctcggccagc 60 gatcgatctc gcctccgcc atg agc gcc acc agg ccc tcc ttc ccc tcc 112 Met Ser Ala Thr Arg Pro Ser Phe Phe Pro Ser 1 5 10
45	aac aac aac agg aac aag ccc gcc acc cgg aac ccc ttc gac tcc gac 160 Asn Asn Asn Arg Asn Lys Pro Ala Thr Arg Asn Pro Phe Asp Ser Asp 15 20 25
50	tcg gac gac gac ggc ggc atg gcc cgg cgc ggc ccg gcg cg 208 Ser Asp Asp Asp Gly Gly Met Ala Arg Arg Gly Pro Ala Arg Ala Ser 30 35 40
55	tcc gtc ccg acc ccc gcc gcg ggg ccg gcc agg gcc tcc tcg gcc ccg 256 Ser Val Pro Thr Pro Ala Ala Gly Pro Ala Arg Ala Ser Ser Ala Pro 45 50 55
60	atc ccc gcc gac gag gcg gac cag cgg ggc gcc ctg ttc ggc gcg ggc 304 Ile Pro Ala Asp Glu Ala Asp Gln Arg Gly Ala Leu Phe Gly Ala Gly 60 65 70 75
65	ccc gcg ccg tcc ggc ttc gcg tcc tcc tcc gcg gcc gcc agg ggc 352 Pro Ala Pro Ser Gly Phe Ala Ser Ser Ser Ala Ala Ala Arg Gly 80 85 90
70	cgg tac agg aac gac ttc cgc gac tcg ggc ggc gtg gag gcg cag tcc 400 Arg Tyr Arg Asn Asp Phe Arg Asp Ser Gly Gly Val Glu Ala Gln Ser 95 100 105
	gtg cag gag ctc gag ggc tac gcg gcc tac aag gcc gag gag acc acg 448 Val Gln Glu Leu Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Lys Ala Glu Glu Thr Thr 110 115 120

41

cgc cggttc gac ggc tgc ctc cggttc gcc gag gag atg cggttc gac acc 496
 Arg Arg Val Asp Gly Cys Leu Arg Val Ala Glu Glu Met Arg Asp Thr
 125 130 135

5 gcg tca aag acc ctgttc cag gtgc acgcaggc cag cag ggc cag cag atc agg 544
 Ala Ser Lys Thr Leu Leu Gln Val His Gln Gln Gly Gln Gln Ile Arg
 140 145 150 155

10 cgc acc cac gcc atgttc gac atc gac cag gat ctc tcc agg ggg 592
 Arg Thr His Ala Met Ala Val Asp Ile Asp Gln Asp Leu Ser Arg Gly
 160 165 170

15 gaa aag cta cta ggt gat ctt ggt ggt ttgttc aag aag tgg aag 640
 Glu Lys Leu Leu Gly Asp Leu Gly Gly Leu Phe Ser Lys Lys Trp Lys
 175 180 185

20 cca aag aac ggc gca atc agg ggc cct atg ctgc acc aga gac gat 688
 Pro Lys Lys Asn Gly Ala Ile Arg Gly Pro Met Leu Thr Arg Asp Asp
 190 195 200

25 tcc ttc ata cgc aag ggc agc cat atg gag cag agg cat aaa ctgttc ggg 736
 Ser Phe Ile Arg Lys Gly Ser His Met Glu Gln Arg His Lys Leu Gly
 205 210 215

30 ctgtca gat cgt ccgtcatcgatcgatccaaatgcacgc cag ttc cta tct gaa 784
 Leu Ser Asp Arg Pro His Arg Ser Asn Ala Arg Gln Phe Leu Ser Glu
 220 225 230 235

35 cccaca tca ggc ctt gag aaa gtc gag gtgc gag aag gca aag cag gat 832
 Pro Thr Ser Gly Leu Glu Lys Val Glu Val Glu Lys Ala Lys Gln Asp
 240 245 250

40 gat ggc ctgttc gac ctt agc gac ata ctgc acc gag ttgttc aaa gga atg 880
 Asp Gly Leu Ser Asp Leu Ser Asp Ile Leu Thr Glu Leu Lys Gly Met
 255 260 265

45 gcc att gac atg gga act gag att gag ggg caa acc aag gat ctt ggt 928
 Ala Ile Asp Met Gly Thr Glu Ile Glu Gly Gln Thr Lys Asp Leu Gly
 270 275 280

50 cat gcg gag aag gac ttt gac gaa ctt aac tac agg gtc aag ggg gca 976
 His Ala Glu Lys Asp Phe Asp Glu Leu Asn Tyr Arg Val Lys Gly Ala
 285 290 295

55 aac gct cga acc cgt cgc ctgttc ggc aga taggcaagaa gcataatgttg 1026
 Asn Ala Arg Thr Arg Arg Leu Leu Gly Arg
 300 305

60 ttcaccagag gattctgtga cactccttat cttctgcatt tgcttcgtg ggctgttaat 1086
 tcagatcatt ttgtgcataa aactctggtt aggaaggtct gttggggagt tgtatcaggg 1146
 tttattgtgt atatacgcta gacggccgt tcgtttctca tggtgcagtt gtactacatt 1206
 tgctatggac agtagatacg tttgttattcg gttttcttgt tttgcaatcg ctatgctgca 1266
 ggaaaagcac 1275

65 <210> 44
 <211> 309
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

70 <400> 44
 Met Ser Ala Thr Arg Pro Ser Phe Phe Pro Ser Asn Asn Asn Arg Asn
 1 5 10 15
 Lys Pro Ala Thr Arg Asn Pro Phe Asp Ser Asp Ser Asp Asp Asp Gly
 20 25 30
 Gly Met Ala Arg Arg Gly Pro Ala Arg Ala Ser Ser Val Pro Thr Pro
 35 40 45

Ala Ala Gly Pro Ala Arg Ala Ser Ser Ala Pro Ile Pro Ala Asp Glu
50 55 60

5 Ala Asp Gln Arg Gly Ala Leu Phe Gly Ala Gly Pro Ala Pro Ser Gly
65 70 75 80

Phe Ala Ser Ser Ser Ala Ala Ala Arg Gly Arg Tyr Arg Asn Asp
10 85 90 95

Phe Arg Asp Ser Gly Gly Val Glu Ala Gln Ser Val Gln Glu Leu Glu
100 105 110

Gly Tyr Ala Ala Tyr Lys Ala Glu Glu Thr Thr Arg Arg Val Asp Gly
15 115 120 125

Cys Leu Arg Val Ala Glu Glu Met Arg Asp Thr Ala Ser Lys Thr Leu
130 135 140

Leu Gln Val His Gln Gln Gly Gln Gln Ile Arg Arg Thr His Ala Met
20 145 150 155 160

Ala Val Asp Ile Asp Gln Asp Leu Ser Arg Gly Glu Lys Leu Leu Gly
25 165 170 175

Asp Leu Gly Gly Leu Phe Ser Lys Lys Trp Lys Pro Lys Lys Asn Gly
180 185 190

Ala Ile Arg Gly Pro Met Leu Thr Arg Asp Asp Ser Phe Ile Arg Lys
30 195 200 205

Gly Ser His Met Glu Gln Arg His Lys Leu Gly Leu Ser Asp Arg Pro
210 215 220

His Arg Ser Asn Ala Arg Gln Phe Leu Ser Glu Pro Thr Ser Gly Leu
35 225 230 235 240

Glu Lys Val Glu Val Glu Lys Ala Lys Gln Asp Asp Gly Leu Ser Asp
40 245 250 255

Leu Ser Asp Ile Leu Thr Glu Leu Lys Gly Met Ala Ile Asp Met Gly
260 265 270

Thr Glu Ile Glu Gly Gln Thr Lys Asp Leu Gly His Ala Glu Lys Asp
45 275 280 285

Phe Asp Glu Leu Asn Tyr Arg Val Lys Gly Ala Asn Ala Arg Thr Arg
290 295 300

Arg Leu Leu Gly Arg
50 305